

DESARROLLO DE MATRICES DE QUITOSANA PARA EL CULTIVO *IN VITRO* DE FIBROBLASTOS

F. A. López Dellamary¹, A. J. Vázquez Anderson^{2*}, A. R. Tenorio Sandoval³

¹Departamento de Madera Celulosa y Papel, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías de la Universidad de Guadalajara

²Posgrado en Ingeniería Química, Depto. de Ing. Química del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías de la Universidad de Guadalajara, jorgevaz@iteso.mx, San Luis Gonzaga 4763-7B, Jardines de Guadalupe, 45030, Zapopan, Jalisco.

³Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente, jorgevaz@iteso.mx, San Luis Gonzaga 4763-7B, Jardines de Guadalupe, 45030, Zapopan, Jalisco.

Abstract- Se desarrollaron dos métodos para la fabricación de membranas de quitosana, para ser utilizadas en cultivos celulares. Dichos métodos son: proceso húmedo y proceso térmico de separación de fases. Se caracterizaron midiendo capacidad de absorción de agua (CAA) y se analizó cualitativamente su morfología con SEM. Se concluye que, es posible predecir la CAA y que, se obtienen diferencias microestructurales al provocar variaciones en el proceso.

Introducción

La quitosana proviene de la N-desacetilación de quitina, biopolímero muy abundante que se encuentra en los exoesqueletos de crustáceos, insectos y en algunos hongos. La quitosana se obtiene generalmente de cáscara de camarón y cangrejo. La quitosana se presenta como un excelente candidato para utilizarse como bioandamiaje en cultivos celulares y de tejidos, así como para la fabricación de prótesis con fines de regeneración de tejidos por sus buenas propiedades mecánicas, su biodegradabilidad y biocompatibilidad, y su vasta actividad curativa, cicatrizante, antibacteriana y antimicótica. Así lo demuestran una amplia cantidad de estudios, en los cuales se reporta su buen desempeño como prótesis capaz de inducir la regeneración de diversos tejidos, y como bioandamiaje capaz de soportar e inducir la implantación y crecimiento de tejidos de gran complejidad (piel, músculo, sangre, hígado, nervios, etc.).^{1,2,3,4,5}

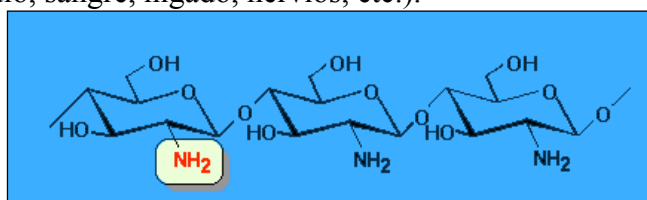


Figura 1: Estructura química de la quitosana

El fibroblasto es la célula propia de los tejidos conjuntivos fibrosos, son células grandes, planas y ramificadas que presentan un contorno fusiforme. Son utilizados como estándar internacional para pruebas de biocompatibilidad de materiales.

Las propiedades mecánicas y la microestructura son parámetros importantes al determinar la idoneidad de un material para el cultivo de tejidos y la liberación controlada de sustancias.⁶

Los materiales en ingeniería de tejidos deben poseer una serie de requisitos como son: biocompatibilidad, estructura porosa adecuada, propiedades mecánicas apropiadas y superficie afín, entre otras. Entre las técnicas de procesamiento de polímeros para ingeniería de tejidos se encuentra la separación de fases⁶ que puede ser inducida de diferentes maneras. El proceso húmedo de separación de fases explota el hecho de que la solubilidad de la quitosana depende del pH de la solución. Para la separación de fases inducida térmicamente, se utiliza la tasa de congelación de la solución como promotor de la separación de fases.

Sección Experimental

Proceso húmedo de separación de fases⁶

1. Se depositó la solución viscosa de quitosana sobre cajas petri.
2. Dicha solución se secó, monitoreando la pérdida de peso.
3. Se le puso en contacto con una base para precipitar durante 3 días.
4. Se retiraron las películas sólidas de quitosana del fondo de la caja petri con los cuidados que se requirieran.
5. Se lavaron exhaustivamente con agua destilada.

Separación de fases inducida térmicamente⁶

1. Igual que el proceso anterior.
2. Las cajas petri con la solución fueron congeladas y liofilizadas.
3. y 4. Iguales a los pasos 3 y 5 del proceso anterior

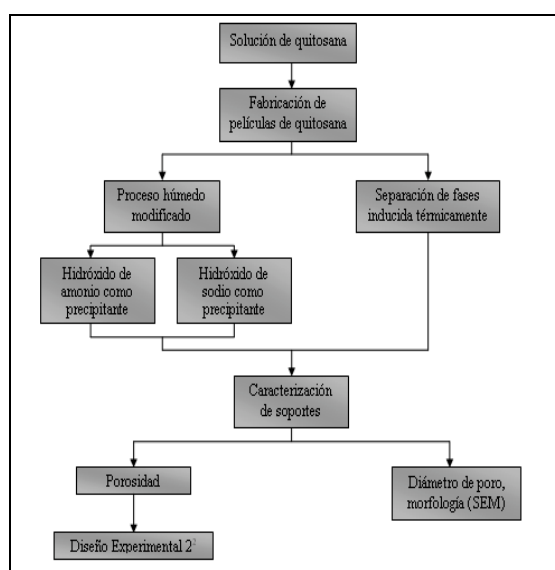


Figura 2: Ruta metodológica para el desarrollo de las matrices de quitosana

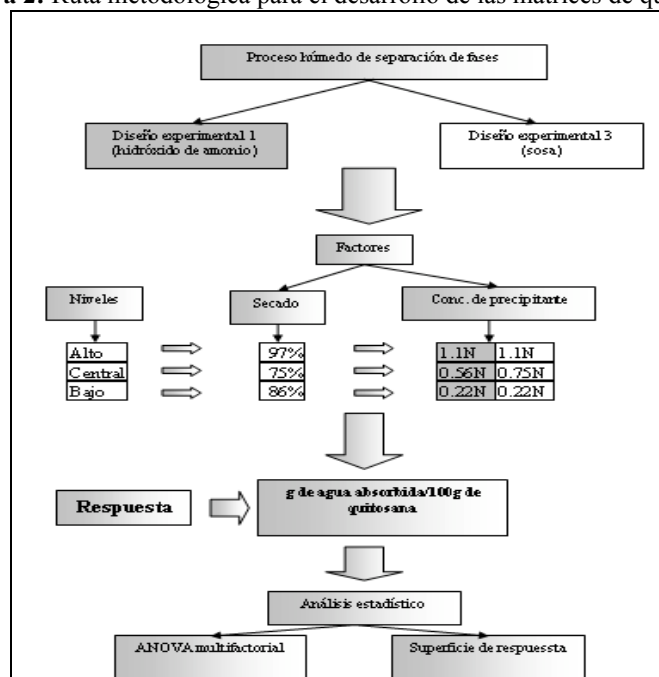


Figura 3. Esquema del diseño experimental y análisis estadístico para el proceso húmedo de separación de fases.

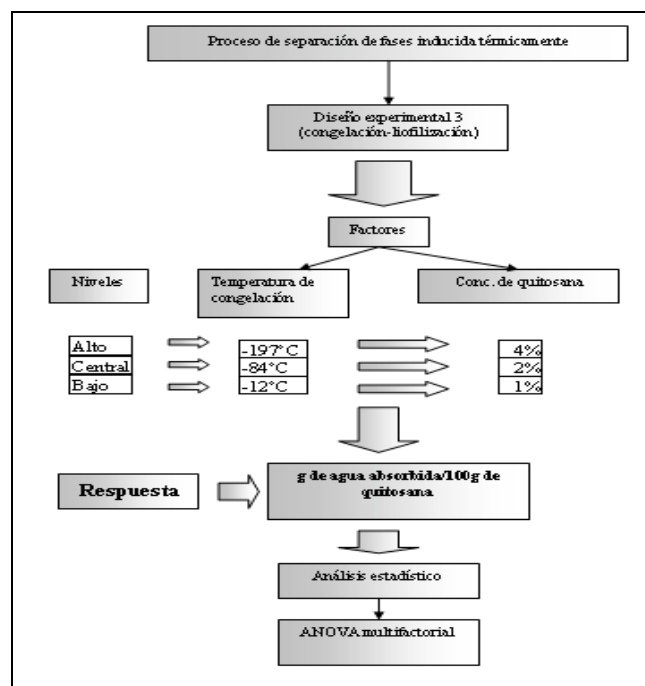


Figura 3. Esquema del diseño experimental y análisis estadístico para el proceso de separación de fases inducida térmicamente.

Resultados y Discusión

Proceso húmedo de separación de fases: Se obtuvieron las siguientes superficies de respuesta que permiten predecir con certeza los g de agua abs./100g de quitosana. Se puede observar en la ilustración 4 que en ambos diseños experimentales, los dos factores tienen influencia sobre la respuesta, sin embargo el secado tiene la mayor influencia. En la parte izq. de la ilustración 4 la curvatura es más pronunciada que en la parte derecha, estadísticamente la contribución de las interacciones entre factores para el diseño experimental 3 es mucho menor que para el diseño experimental 1. En las ilustraciones 5 y 6, se presentan fotografías de SEM que exhiben la influencia que ejerció sobre la consolidación de las membranas, la utilización de diferentes precipitantes. La sosa, por su mayor carácter básico, logró consolidar las películas en estructuras más cerradas y compactas, que demostraron tener mayor resistencia a la manipulación. Lo anterior junto con lo encontrado estadísticamente al construir la superficie de respuesta, sostiene la idea de que el uso de diferentes álcalis, sí produce diferencias a nivel estructural.

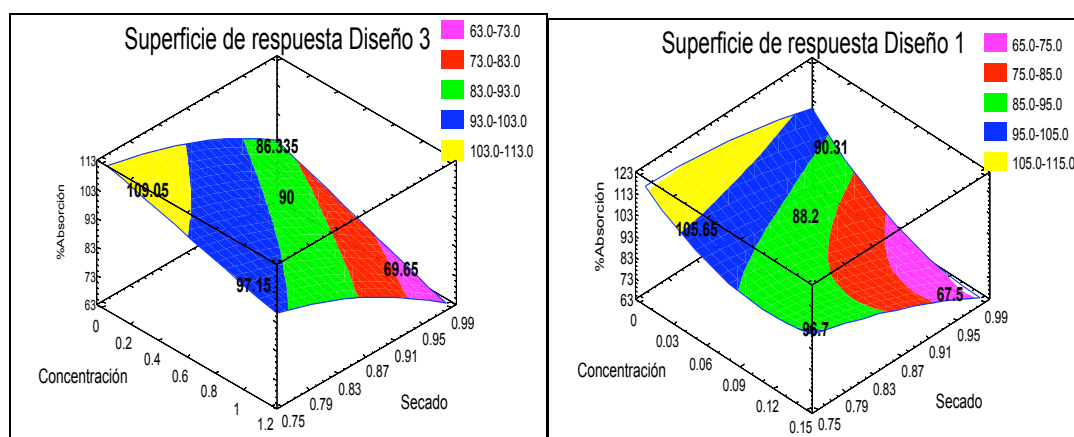


Figura 4: Superficies de respuesta para el diseño experimental 1 y 3 (hidróxido de amonio, izq.) y 3 (hidróxido de sodio, der.)

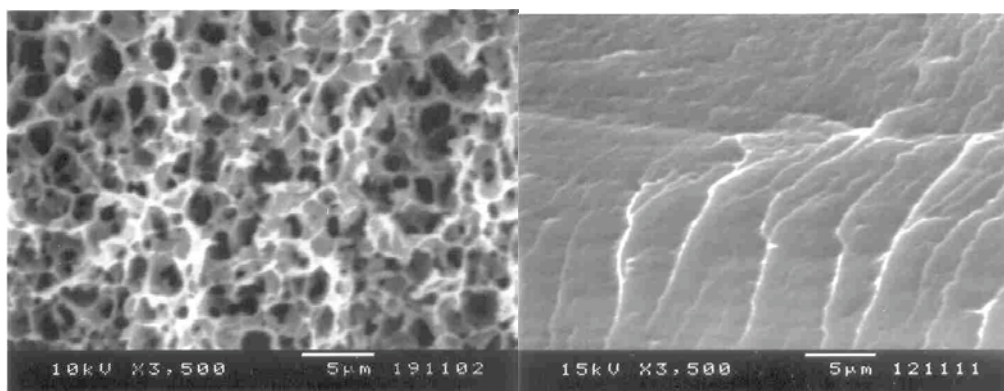


Figura 5: Sección transversal. Concentración alta, secado bajo. Amoniac (izq) y sosa (der).

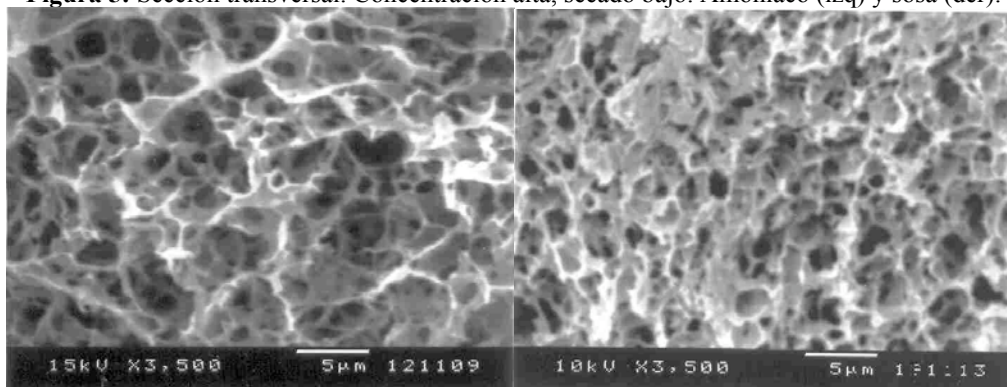
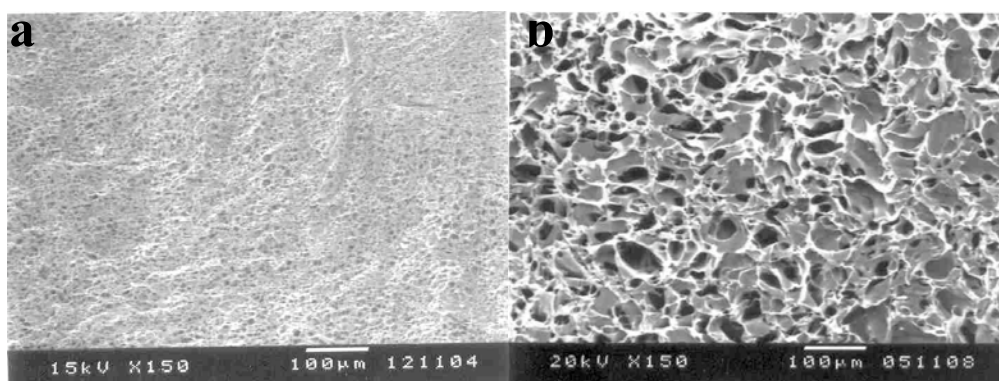


Figura 6: Sección transversal. Concentración baja, secado bajo. Amoniac (izq) y sosa (der).

Proceso térmico: Se encontró que la concentración de quitosana tiene efecto sobre la CAA, mientras que la temperatura de congelación no produjo diferencias estadísticamente significativas. Por lo anterior no se pudo obtener una superficie de respuesta que permitiera predecir la CAA. A pesar de que el proceso no pudo ser controlado debido fundamentalmente a inconsistencias en la congelación-liofilización, se pudo obtener una gama de microestructuras de gran interés para el cultivo de células. En la ilustración 7 se observan microestructuras muy diversas, en general presentan poros más abiertos y exhibidos, así como paredes más delgadas. Las discrepancias en el proceso se observan claramente en la fotografía 7a que es una muestra réplica de la 7b. En la ilustración 8 se expone un corte transversal representativo de este diseño, se observan capas que se asemejan a “hojas apiladas”. Las estructuras obtenidas por medio del proceso térmico son macroporosas mientras que las del proceso húmedo son microporosas.



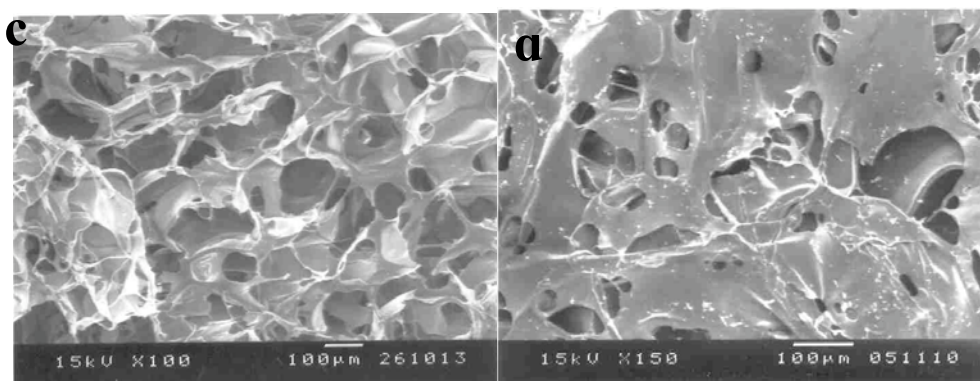


Figura 7: Gama de estructuras obtenidas mediante el proceso térmico (superficie).

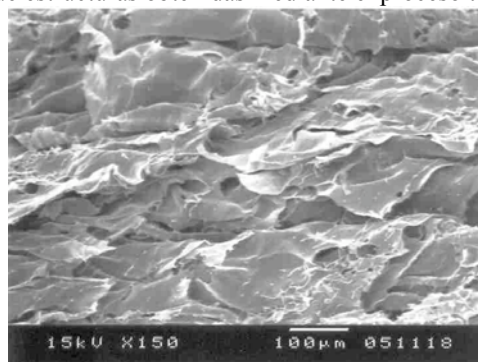


Figura 8: Muestra representativa de la sección transversal para el proceso térmico

Conclusiones

1. Se produjeron diferencias microestructurales variando los factores seleccionados para cada proceso.
2. Se obtuvo una superficie de respuesta que permite predecir la CAA para el proceso húmedo.
3. Por su mayor carácter básico la sosa como precipitante produce membranas con estructuras más compactas y con mejores propiedades mecánicas que el amoníaco.
4. El proceso térmico no pudo ser controlado en las condiciones en que se llevó a cabo, sin embargo produce estructuras interesantes y geometrías complejas.
5. La metodología desarrollada y estandarizada para el proceso húmedo produce películas factibles de ser utilizadas en investigación biomédica por la gama de estructuras obtenida.
6. Se recomienda experimentar con las membranas obtenidas por el proceso húmedo: las más porosas en cultivos celulares y las menos como revestimiento de heridas.
7. El proceso térmico podría ser utilizado para fabricar prótesis de regeneración de tejidos.

Agradecimientos

Al Dr. Fernando Antonio López Dellamary Toral, al M. en C. José Orozco González Aréchiga, al Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente (ITESO), al M. en C. Ricardo Solís Zamora, al Dr. Joaquín García Estrada y a la Dra. Ma. Sonia Luquín de Anda, a la M. en C. Lucía Barrientos y al M. en C. Jesús, al M. en C. Israel Ceja, a la Universidad de Guadalajara (UDG) y al Programa de Apoyos Estratégicos a la Investigación (PROPESTI).

Referencias

1. Chavez-Delgado, M.E., et. al.; *J. Biomed. Mat. Res.* 2003, 67B, No. 2, pp.702-711.
2. Cai, Kaiyong; et. al.; *J. of Biomat. Sci., Polymer Edition.* 2002, Vol. 13, No. 1, pp.53-66.
3. Risbud, M. V.; et. al. ; *J. of Biomat. Sci., Polymer Edition.* 2003, Vol. 14, No. 7, pp.719-731.
4. Ng, K. W.; Khor, H. L.; Hutmacher, D. W. *Biomat.* 2004, Vol. 25, No. 14, pp.2807-2818.
5. Li, Jieliang; et. al. *Biomat.* 2003, Vol. 24, No. 13, pp.2317-2322.
6. Roh, Il Juhn; Kwon, Ick-Chan. *J. of Biomat. Sci., Polymer Edition* 2002 Vol. 13, No. 7, pp. 76