

SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN BIOMATERIAL REABSORBIBLE DE FUENTE NATURAL RENOVABLE A PARTIR DE GOMA KARAYA, GELATINA Y PROTEÍNAS NATIVAS DEL SEMEN DE LA TILAPIA (*Oreochromis niloticus*).

B. E. Moreno Martínez^{1*}, E. F. Rubio Cruz¹, T.J. Szymanski Ramírez¹, G. P. Gómez Mendoza¹, R. Fernández Martínez², A. M. Mendoza Martínez¹.

^{1*} *División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Ciudad Madero. Juventino Rosas y Jesús Urueta S/N Col. Los Mangos, Cd. Madero, Tamaulipas, C.P. 89444, E-mail:anamendo@prodigy.net.mx; beatrizeugenia_m_mtz@yahoo.com.mx*

² *Centro Regional de Investigación Pesquera de Tampico. Prolongación Altamira S/N, Isleta Pérez, C.P. 89090, Tampico, Tamaulipas, E-mail: rfernandez_inp@hotmail.com.*

Resumen

Gran cantidad de materiales con fines biomédicos se han sintetizado con el objetivo de ser polímeros liberadores de fármacos incluyendo aún en su formulación materiales sintéticos en su composición. El presente trabajo tiene como meta la búsqueda de materiales completamente naturales cuyas características sean adecuadas para desarrollar un biopolímero capaz de presentar propiedades físicas y químicas importantes en el campo de la biomedicina. Los materiales utilizados son biopolímeros de fuente natural renovable, los cuales no han sido investigados en conjunto para elaborar un hidrogel con los fines antes mencionados. La goma karaya, la gelatina de piel de pescado y la protamina grado comercial y nativa del semen de la tilapia han aportado resultados importantes, tales como sus propiedades reológicas, propiedades térmicas, propiedades de absorción de fármacos tal como la estreptomycin, por citar algunas de estas propiedades. Debido a las propiedades de absorción y degradación, este hidrogel se ha considerado como biomaterial reabsorbible por sus propiedades. El biopolímero se obtuvo mediante el método simultáneo bajo condiciones específicas, tanto de control de temperatura (40°C), como de control de agentes físicos y químicos, ya que el pH puede interferir en la síntesis. La síntesis del hidrogel se realizó en medio acuoso, utilizando como medio de disolución agua desionizada.

Introducción

En la actualidad existe una amplia gama de información sobre los seres vivos. Los seres vivos están constituidos de arreglos de moléculas complejas a las cuales denominamos genéricamente biomoléculas. Únicamente existen cuatro tipos de estas moléculas: los ácidos nucleicos –ADN y ARN- que son los componentes del genoma, los carbohidratos –glucosa-, los lípidos –colesterol- y las proteínas. Otro grupo importante dentro de los materiales utilizados en esta síntesis son los hidrocoloides.

La goma karaya es un hidrocoloide natural, proveniente del exudado seco de árbol *Sterculia urens*, la cual pertenece a la familia Sterculiaceae. La goma karaya se encuentra naturalmente como un complejo parcialmente acetilado, la estructura química de la goma consiste en un polisacárido ácido y acetilado (8% de grupos acetilos y 37% de residuos de ácidos uránicos). Los principales constituyentes de la cadena macromolecular son D-galactosa, L-ramnosa y ácido galacturónico.

El número de grupos hidroxilos encontrados en la goma es aproximadamente de 13.4 a 22.7 grupos OH's. Este hidrocoloide de alto peso molecular es completamente compatible con proteínas, se le considera el menos soluble de los hidrocoloides, sin embargo, el material comercial utilizado en este trabajo de investigación es completamente soluble en agua, a una temperatura entre 30 y 50 °C, ya que al encontrarse finamente molido, éste absorbe agua muy fácilmente. La gelatina de la piel del pescado es el producto de la disociación térmica de las moléculas del colágeno. Las gelatinas poseen pesos moleculares del orden de 100,000 kDa, el elemento básico en la configuración del

colágeno es la unidad de tropocolágeno y está compuesta de tres polipéptidos helicoidales. La gelatina es una sustancia proteica soluble en agua. La gelatina de la piel de pescado puede tener propiedades gelantes o no gelantes. La protamina es otra proteína, extraída del semen de los peces, es importante destacar que la protamina no se encuentra en todos los peces. Los estudios de extracción y purificación se basan principalmente en la extracción de peces de aguas frías, especialmente del salmón. Esta nucleoproteína es una sustancia básica que se encuentra combinada con el ácido nucleínico en los espermatozoides de los peces, son solubles en agua y actúan como precipitantes de otras proteínas solubles. Las propiedades que presenta el material sintetizado a partir de estos biopolímeros, han dado como resultado un material que es capaz de hincharse lo suficiente para albergar moléculas medicinales en su estructura tridimensional, tal como sucede con el fármaco estreptomycin. Además de la capacidad de hinchamiento, el material obtenido es un hidrogel completo, es decir, presenta de tres temperaturas de transición vítrea correspondientes a cada una de las transiciones de los homopolímeros. Es importante destacar que la unión de los homopolímeros, (Goma Karaya, Gelatina de piel de pescado y la protamina), produce propiedades bastante adecuadas para la liberación de fármacos. La caracterización que se utilizó para esta parte del trabajo consistió en el uso de las técnicas de FTIR, DSC, pruebas de absorción con solución neutra y estreptomycin, así como el análisis elemental CHON.

Metodología

La solubilidad en el agua era un factor común en la selección de dichas materias primas. Encontrando que la interacción entre la goma karaya y la protamina era muy fuerte, debido a la presencia de los taninos contenidos en la estructura de la goma karaya; estos compuestos precipitan proteínas debido a su astringencia. La proteína extraída del semen de los peces (protamina) se obtuvo en cantidades pequeñas. Así como también la protamina grado comercial, por tanto la cantidad utilizada en la formulación fue pequeña.

La síntesis del biomaterial se llevó al cabo en un reactor de vidrio utilizando como disolvente agua (medio dispersante), manteniendo la temperatura a 40 ± 1 °C y agitación controlada para evitar la desnaturalización de las proteínas y evitar la pérdida de las estructuras de orden superior (secundaria, terciaria y cuaternaria), la desnaturalización en este sistema puede ocurrir de 5 formas: *a*) por pH extremo, *b*) por velocidad de agitación, *c*) por temperatura superior a 40°C, *d*) por la adición de agentes físicos o químicos y finalmente *e*) por la concentración de taninos presentes en la goma karaya. Por tanto fue de suma importancia controlar estos parámetros y de esta forma evitar la pérdida de actividad biológica en ellos. Los polímeros utilizados fueron marca Sigma-Aldrich. El método utilizado para realizar la síntesis del hidrogel fue el método simultáneo. El tiempo de agitación variaba con respecto a la naturaleza de la proteína agregada, no siendo así para el polisacárido. Posteriormente se agregó el iniciador (KCl), en una concentración 1% wt y el glutaraldehído como agente entrecruzante en una concentración 1% wt. El agente de entrecruzamiento cumple un papel muy importante en la reacción ya que desde el punto de vista químico, el glutaraldehído es un producto muy reactivo que polimeriza en agua. En medio alcalino, como sucede en este caso debido al pH 12 de la protamina, la reactividad es más alta, pudiendo llegar a ser violenta a pH elevados. En este medio, a temperatura de 45 ± 1 °C, reacciona rápidamente con los grupos amino de las proteínas, desnaturalizándolas, razón por la cual se utilizó en proporciones pequeñas. El diseño de experimentos se obtuvo utilizando el Mini-Tab, éste se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Diseño de experimentos utilizado para la síntesis de hidrogeles a partir de GK/GF/Z₁.

RELACIÓN		% INICIADOR			% ENTRECruzANTE		
GK/GF/Z ₁		KCI			GLUTARALDEHIDO		
A	70/20/10	1.5	2.0	2.5	1.5	2.0	2.5
B	20/70/10	1.5	20	2.5	1.5	2.0	2.5
C	45/45/10	1.5	2.0	2.5	1.5	2.0	2.5

Resultados y Discusión

Los materiales obtenidos se analizaron mediante las técnicas de absorción axial, DSC, FTIR y análisis elemental. Los resultados observados en DSC indican la presencia de una red tridimensional completa, ratificándose mediante las pruebas de absorción. Las muestras de goma karaya/gelatina de la piel de pescado/protamina fueron analizadas mediante las técnicas de FTIR antes del procedimiento de absorción y después del procedimiento de absorción, utilizando solución neutra y estreptomycin. En los análisis de FTIR después del proceso de hinchamiento se observa la ausencia de grupos funcionales debido al erosionamiento por exceso de solución acuosa. En la figura 1 el espectro de infrarrojo de la muestra de Goma Karaya/Gelatina de la Piel de pescado/ protamina [GK/GF/Z₁ (70/20/10)] con una conc. de 1.5 % de iniciador y 1.5 % de entrecruzante antes del hinchamiento con estreptomycin.

Se pueden observar los principales grupos funcionales característicos de las proteínas; en la banda de 3301 cm⁻¹ se observan los grupos OH correspondientes al polisacárido, a los 2926 cm⁻¹ se observa el grupo CH₃ y CH₂, en la banda de los 1849 cm⁻¹ se observa el grupo carbonilo correspondiente a las proteínas así como también restos de agente entrecruzante que no reaccionaron situado en los 1724 cm⁻¹, el grupo NH se encuentra presente en los 1591 cm⁻¹ y se observa ligeramente una formación al lado derecho en los 1570 cm⁻¹ el grupo imino correspondiente a la interacción del glutaraldehído y la gelatina, lo que nos indica que se lleva a cabo la reacción, aunque quedan restos de iniciador que se observan en la banda correspondiente en los 764 cm⁻¹ del cloruro de potasio. Al realizar las pruebas de absorción con estreptomycin se logra observar un fenómeno llamado *erosionamiento de grupos funcionales* ^[1], este efecto se debe al exceso de solución acuosa presente dentro de la estructura molecular del biopolímero provocando un desgaste en la muestra como se observa en la figura 2. En esta figura, se puede notar el ensanchamiento de la banda de los 3363 cm⁻¹ correspondiente al los grupos OH del polisacárido y del medio dispersante de la estreptomycin que es agua. Se exhibe también la banda de los 1673 cm⁻¹ más acentuada que en la figura 1, esto debido a la presencia de los grupos COOH correspondientes a la estreptomycin, así como también la banda ubicada en los 1036 cm⁻¹ la cual corresponde a los alcoholes primarios característicos de la estreptomycin.

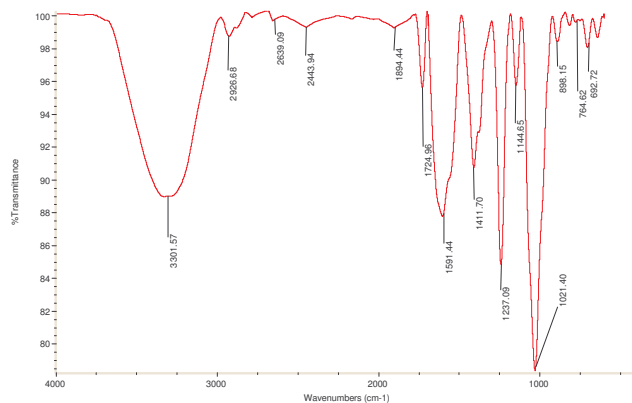


Figura 1. Espectro de infrarrojo de la muestra de Goma Karaya/Gelatina de la piel de pescado/Protamina de la relación (70/20/10) con una conc. de 1.5% de KCl (iniciador) y 1.5% de Glutaraldehído (agente entrecruzante) antes de la prueba de absorción con estreptomicina.

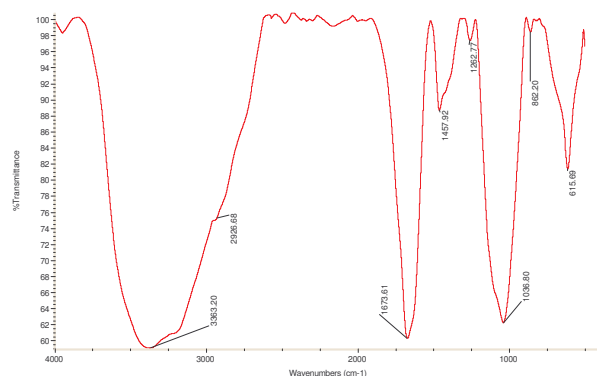


Figura 2. Espectro de infrarrojo de la muestra de Goma Karaya/Gelatina de la piel de pescado/Protamina de la relación (70/20/10) con una conc. de 1.5% de KCl (iniciador) y 1.5% de Glutaraldehído (agente entrecruzante) después de la prueba de absorción con estreptomicina.

El proceso de hinchamiento de las muestras duró alrededor de 72 horas. En las figuras 3 y 4 se presentan las pruebas de absorción axial con estreptomicina a pH 6; observándose la tendencia de las pruebas de absorción utilizando estreptomicina, las condiciones bajo las cuales se llevaron al cabo dichos procedimientos fueron; una temperatura constante de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad del 50%. La figura 4 muestra el % de absorción con una relación de Goma Karaya/Gelatina de la piel del Pescado/Protamina [(GK/GF/Z1) (45/45/10)] en donde se observa la absorción del material bioactivo, la disminución en la absorción del mismo se debe a la cristalización del fármaco en un lapso de una hora. En la figura 5 se observa el termograma correspondiente a la muestra [GK/GF/Z1 (70/20/10)] en donde se presentan las Tg's de cada uno de los homopolímeros. Se hicieron 2 barridos, el primero con una velocidad de $20^\circ\text{C}/\text{min}$ y el segundo con una velocidad de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ en donde se observan estas Tg's a -49°C para la gelatina de la piel del pescado, 40.60°C para la protamina y 112°C para la goma karaya lo que indica la presencia de una red polimérica completa. En la figura 5b se observa el mismo comportamiento para la relación 20/70/10 de goma karaya/gelatina de la piel de pescado/protamina utilizando 2.5 5 de entrecruzante y 2.0 % de iniciador.

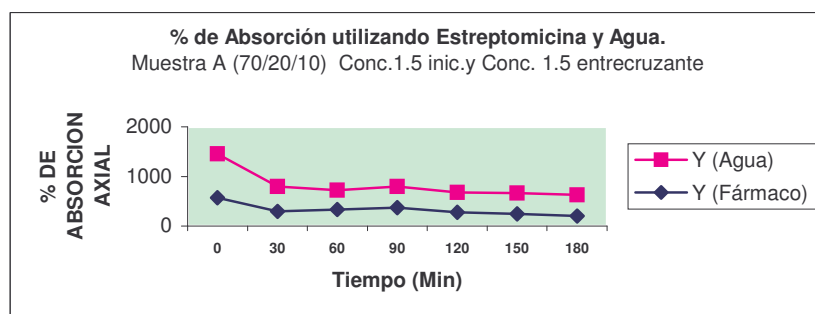


Fig. 3 Porcentaje de absorción utilizando estreptomicina y agua para la muestra A.

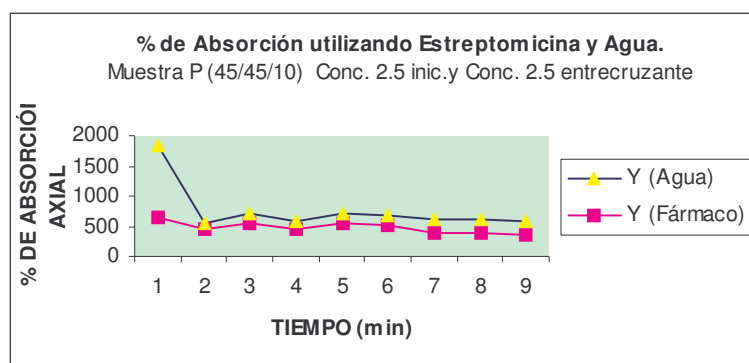


Fig. 4 Porcentaje de absorción utilizando estreptomicina y agua para la muestra P.

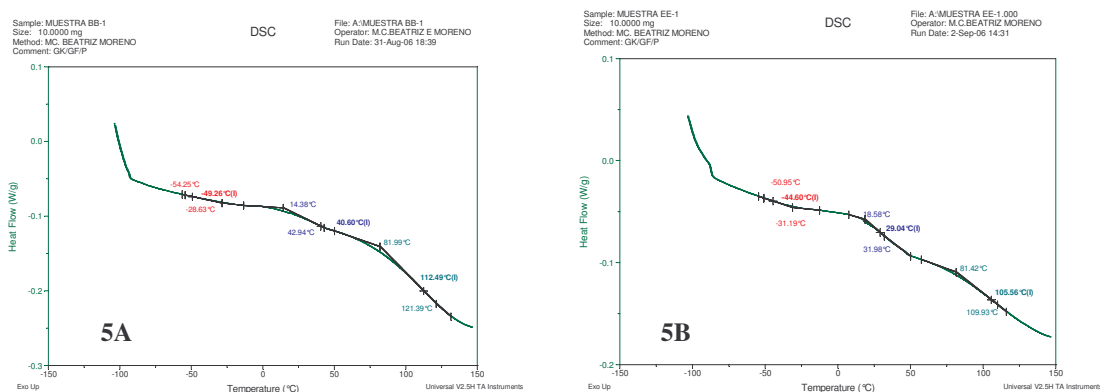


Figura 5. (A) Termograma para la relación 70/20/10 de goma karaya/Gelatina de la piel de pescado/Protamina, (B) Termograma para la relación 20/70/10 de goma karaya/Gelatina de la piel de pescado/Protamina.

Conclusiones

El análisis de calorimetría diferencial de barrido, permite observar las temperaturas de transición vítrea de cada uno de los biomateriales utilizados, indicando la formación de una red completa, ya que este material se hincha y no se solubiliza, así como también se concluye que es un buen receptor de fármaco, sin embargo posee como restricción el tamaño de la molécula de dicho material bioactivo.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo del COSNET clave 403.04-P y al CONACYT por la beca otorgada con número de registro 185652.

Referencias

- 1.- J. Sujja-areevath, D.L. Munday, P.J. Cox, K.A. Khan., in Relationship between swelling, erosion and drug release in hydrophilic natural gum mini-matrix formulations, 2004.