



Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C.

**BIOMATERIALES PARA MEDICINA REGENERATIVA: OBTENCIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE OLIGÓMERO DE QUITOSANO PARA USO COMO
SUSTITUTO DÉRMICO.**

Informe de quien presenta

ARTURO BARRAZA ROVIRA

En presentación para la materia Proyectos VII

Asesor

DR. JUAN VALERIO CAUICH RODRÍGUEZ

Coasesora:

TECNICA ROSSANA FARIDE VARGAS CORONADO

Mérida, Yucatán

Noviembre, 2024

Tabla de contenido

RESUMEN	3
CAPÍTULO 1. Introducción	4
CAPÍTULO 2. Marco teórico	11
CAPITULO 3. Desarrollo	21
CAPÍTULO 4. Resultados	28
CAPÍTULO 5. Conclusiones	33
REFERENCIAS	35
LISTA DE FIGURAS	37
LISTA DE TABLAS	38
ANEXO 1	39

RESUMEN

En este trabajo de titulación se basa en la obtención y diseño de un sustituto dérmico a base de oligómeros de quitosano y ácido hialurónico por medio del método de degradación oxidativa, obtención de mezclas poliméricas de ácido hialurónico con oligómeros de quitosano y la caracterización de éstos para su posterior aplicación en usos médicos. Se combinan ciertas características antimicrobianas, biocompatibles y regenerativas del quitosano con las propiedades biológicas y funcionales del ácido hialurónico para su aplicación biomédica; el uso de un refuerzo como el ácido hialurónico conlleva a la posibilidad de incrementar los propiedades y beneficios del sustituto dérmico en la piel.

Se estudiaron las condiciones y metodologías de la obtención de los oligómeros de quitosano por el método reportado por Tao Sun (peróxido de hidrógeno) y Yunpeng Cai (peryodato de sodio) donde las variables que se controlan y modifican son: volumen del oxidante, tiempo de degradación, volumen del reactivo que se utiliza para la precipitación de los oligómeros de quitosano y el tiempo de reposo para permitir la precipitación; cabe destacar que modificando alguna variable de la metodología seleccionada influye en la calidad y características de los oligómeros obtenidos.

Se prepararon mezclas poliméricas de ácido hialurónico en combinación de los oligómeros de quitosano, así como la caracterización de estas mezclas mediante distintas técnicas específicas como FTIR, RAMAN y microscopía donde se analiza la estabilidad térmica del material, estructura química, la interacción molecular, etc. Este análisis permite entender cómo las proporciones o concentraciones afectan las propiedades del sustituto dérmico.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presentará toda la investigación previa realizada para la metodología, la planeación de los objetivos, la justificación del trabajo realizado y de la misma forma la serie de pasos con los cuales se llevará a cabo el trabajo de tesis.

1.1 Antecedentes

El quitosano y el ácido hialurónico son dos sustancias que han ganado popularidad en la medicina y la cosmética como alternativas o complementos a otros tratamientos dérmicos, debido a sus propiedades biocompatibles y sus beneficios para la piel. El quitosano es un biopolímero derivado de la quitina, que se encuentra en los exoesqueletos de crustáceos como camarones y langostas, en su forma procesada el quitosano se ha utilizado en aplicaciones médicas, cosméticas y farmacéuticas; además su principal característica es su capacidad para formar una película protectora y mejorar la cicatrización de heridas, lo que lo hace adecuado para su uso en sustitutos dérmicos. Por otro lado, el ácido hialurónico es una sustancia naturalmente presente en el cuerpo humano, especialmente en la piel, el cartílago, los ojos y los tejidos conectivos. Tiene una capacidad única para retener agua, lo que lo convierte en un potente hidratante. Investigaciones han explorado la aplicación del quitosano en ingeniería de

tejidos como sustitutos dérmicos para la regeneración de la piel dañada, especialmente en quemaduras y heridas crónicas, mientras que el ácido hialurónico ha sido extensamente investigado por su capacidad para mejorar la hidratación y promover la regeneración dérmica.

1.2 Planteamiento del problema

La piel es el mayor órgano del cuerpo humano y su daño o lesión puede tener consecuencias graves en la salud y calidad de vida, es por eso por lo que la búsqueda de sustitutos dérmicos efectivos y biocompatibles es un desafío constante en el desarrollo de biomateriales y materiales poliméricos. El desarrollo de sustitutos dérmicos aumenta la eficacia de curación en el tratamiento de quemaduras, heridas crónicas y enfermedades de la piel, de la misma forma mejora la regeneración tisular y reduce el riesgo de infecciones y también cicatrices, es así que los sustitutos dérmicos sirven como una alternativa innovadora a los métodos tradicionales al tratar con heridas similares, un método muy común es el uso de antibióticos pero éste termina siendo contraproducente pues el mismo cuerpo genera resistencia bacteriana al uso constante de antibióticos; no obstante, se debe hacer énfasis en que los biomateriales son fundamentales para mejorar la calidad de vida y salud humana, pues el objetivo de un biomaterial es reemplazar y/o tratar de mejorar las funciones biológicas y promover la regeneración de tejidos dañados. El quitosano es un polisacárido natural con propiedades y funciones únicas en aplicaciones biomédicas e industriales; unas ventajas y beneficios son su buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad, además de las actividades biológicas que poseen como su capacidad antimicrobiana. Por otra parte, el ácido hialurónico es un polisacárido natural que se encuentra en los tejidos vertebrados, presente en tejido conectivo, piel, líquido sinovial; y en cuanto a sus propiedades, tiene una excelente biocompatibilidad

con el cuerpo humano. El alto peso molecular y alta viscosidad del quitosano limita su uso en aplicaciones biológicas, pero sometido a procesos de despolimerización para obtener un peso molecular más bajo (quito-oligómeros, monómeros, etc) existen muchas aplicaciones.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Desarrollar y caracterizar mezclas poliméricas de ácido hialurónico y oligómeros de quitosano para la fabricación de películas aplicadas como sustituto dérmico.

1.3.2 Objetivos específicos

- Obtener oligómeros de quitosano y determinar su estructura con caracterización mediante FTIR, Raman y TGA.
- Obtener ácido hialurónico degradado y determinar su estructura con caracterización mediante FTIR, Raman y TGA.
- Desarrollar películas y evaluar sus propiedades fisicoquímicas mediante FTIR, Raman y TGA.
- Realizar pruebas de hemocompatibilidad y hacer pruebas con pacientes.

1.4 Justificación

Los diferentes sustitutos dérmicos optimizan, reduciendo su morbimortalidad, el tratamiento de las quemaduras profundas y extensas; también pueden proponerse a los pacientes que presentan grandes deterioros cutáneos: politraumatismos, avulsiones, dermoepidermitis bacterianas necrosantes extensas o exéresis oncológicas amplias. El porvenir de los pacientes mejoraría en gran medida, tanto desde el punto de vista de la mortalidad como de los resultados funcionales y estéticos. (E. Dantzer, 2015)

Los biomateriales son fundamentales para mejorar la calidad de vida y la salud humana, esto debido a que su objetivo es reemplazar y/o tratar de mejorar las funciones biológicas y promover la regeneración de tejidos dañados. Asimismo, pretenden tratar infecciones por medio del desarrollo de materiales que, a través de sus propiedades, evitan complicaciones adversas a procesos médicos de tratamiento, rehabilitación o cirugía.

Este proyecto se justifica por su contribución en el desarrollo de biomateriales en Medicina Regenerativa, un campo en el que son necesarias la precisión y eficacia en síntesis y caracterización de materiales; la investigación se centra en la exploración y perfeccionamiento de procesos para obtener y analizar oligómeros de quitosano y ácido hialurónico, los cuales poseen propiedades regenerativas.

1.5 Método

- Investigación y planteamiento de metodología: en esta etapa se realizará una previa búsqueda e investigación de lo que se hará, los materiales necesarios que serán requeridos y cómo se obtendrá la estructura deseada de los oligómeros de quitosano.
- Preparación de oligómeros y síntesis: en esta etapa se realizará la degradación del quitosano en el ácido acético, reparando la solución adecuada se dejará de uno a dos días en agitación permitiendo así una mezcla completamente homogénea.
- Pre-equilibrio: en esta etapa a la solución previamente realizada se le añadirá una cantidad de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) permitiendo así una oxidación oxidativa y se calentará en un baño de agua a una temperatura adecuada.
- Filtrado y decantación: en esta etapa la solución se filtrará con un embudo de Buchner de presión reducida para separar fracciones solubles e insolubles; posteriormente se combinará con etanol y se dejará reposar por 24 horas para dejarle decantar.
- Centrifugación: en esta etapa se separan las partes insolubles en agua y se llevará a cabo un proceso de centrifugado en la solución decantada para eliminar cualquier impureza o material no deseado.
- Secado: en esta etapa el producto se seca con una liofilizadora para obtener los oligómeros de quitosano solubles en agua.

- Caracterización: en esta etapa se realizarán las pruebas de los oligómeros obtenidos mediante UV,FTIR y TGA para ver los grupos que se obtuvieron de las muestras y sus propiedades fisico-químicas, mecánicas y su hemocompatibilidad.
- Diseño: en esta etapa se diseñará la película en combinación con el ácido hialurónico.
- Pruebas experimentales: en esta etapa se realizarán las pruebas in vitro o in silico para poder verificar la efectividad de los grupos químicos presentes de los oligómeros obtenidos y poder así comprobar su actividad recuperativa en los tejidos y su cicatrización.
- Documentación: en esta etapa se recuperará toda la información investigada previamente y se compararán los objetivos y los resultados esperados con lo obtenido y sus efectos en las pruebas experimentales.

1.6 Esquema general

En el capítulo 2 se podrá encontrar el marco teórico, éste hará referencia a los componentes usados para el sustituto dérmico (ácido hialurónico y el quitosano), sus propiedades y en qué beneficiarían al área o tejido dañado, el método de despolimerización, algunos ejemplos ya existentes de sustitutos dérmicos y las condiciones clínicas que son importantes de tener en cuenta a la hora de realizar la experimentación.

En el capítulo 3 se hablará de la metodología implementada y el desarrollo de la obtención de los oligómeros, tomando en cuenta las variables que se tomaron en cuenta y si hubo

modificaciones en comparación a la referencia en cuanto a las condiciones empleadas originalmente.

En el capítulo 4 se presentarán evidencias fotográficas de los resultados obtenidos, así como tablas con datos cuantitativos de los oligómeros obtenidos y los resultados de la caracterización (FTIR y RAMAN).

En el capítulo 5 se discutirá la conclusión derivada de los resultados obtenidos, donde se planteará alguna opción respecto a los resultados y si se mantendrá en seguimiento o innovación la idea y trabajo presentado.

Capítulo 2.

MARCO TEÓRICO

Ácido hialurónico

El ácido hialurónico es un polisacárido natural conformado por unidades de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina unidas linealmente de manera alternada por uniones 1-3 y 1-4. Se encuentra en los tejidos vertebrados como un componente clave de la matriz extracelular; está presente en tejido conectivo, piel, ojo y líquido sinovial, donde es secretado continuamente por la membrana sinovial en el espacio articular y constituye la parte macromolecular principal del tejido sinovial. [01]

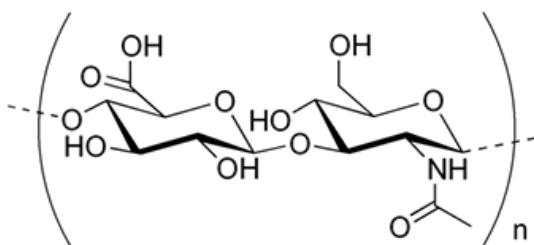


Figura 1. Estructura del Ácido Hialurónico

Este polímero aniónico lineal tiene una estructura semiflexible, lo que provoca que adopte una forma de bobina expandida similar a un gusano; cuando las cadenas de CH están agrupadas, sus dominios se ven obligados a interpenetrarse, lo que conduce a un comportamiento no lineal. [02]

Obtención del Ácido hialurónico

El ácido hialurónico se encuentra presente naturalmente en la matriz extra y pericelular de todo organismo viviente. Biológicamente posee la función de mantener la elasticidad de los líquidos sinoviales e intraoculares y la hidratación de los tejidos, facilitar el transporte de agua en la matriz celular y el ensamblaje supramolecular de proteoglicanos en la matriz extracelular. (J. Necas, et al, 2008) [01]. El contenido de AH también puede determinarse mediante el análisis de los productos de oligosacáridos de la digestión enzimática, esta cuantificación se realiza mediante métodos de HPLC, electroforesis capilar (CE), espectrometría de masas o electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforo. [02]

Propiedades del AH para regeneración de tejidos

El ácido hialurónico es un biopolímero de particular interés debido a que tiene propiedades de biocompatibilidad con el cuerpo humano. Recientemente se ha demostrado que el AH desempeña una multitud de roles biofísicos, bioquímicos y regulatorios celulares en los tejidos sinoviales de las articulaciones: disminuye la sequedad en la piel y ofrece un gran potencial para la revitalización de la piel, la mantiene suave, lubrica articulaciones y desempeña un papel crucial en mejorar la condición de la piel y heridas. Está implicado en muchos procesos biológicos, incluyendo la fertilización, desarrollo embrionario, la migración y diferenciación celular, la cicatrización de heridas, la inflamación, el crecimiento y la metástasis de células tumorales, y siempre que ocurra una rápida renovación y reparación de tejidos (Csoka et al., 1997). [03]

Quitina y Quitosano

La quitina y el quitosano son materiales naturales muy utilizados actualmente, pues se trata de una pareja de polisacáridos que ha tomado demasiado auge por la infinidad de aplicaciones que ha logrado sobre todo para el área de medicina, además de que presentan muy poco impacto ambiental, lo que los convierte en biopolímeros ideales para trabajar. Ambos biopolímeros están químicamente emparentados; la quitina, por su parte, es una poli(β -N-acetil-glucosamina) la cual, mediante una reacción de desacetilación que elimine al menos un 50 % de sus grupos acetilo, se convierte en quitosano (poli β -N-acetil glucosamina-co- β -glucosamina). [04]

Quitina

La quitina se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza y, después de la celulosa (materia base del papel), es el segundo polisacárido en abundancia. Sus fuentes principales son el exoesqueleto (caparazón) de muchos crustáceos, alas de insectos (escarabajos, cucarachas), paredes celulares de hongos, algas, etc. [05] Entre los derivados de la quitina, el más importante es la quitosana, que también puede hallarse en la naturaleza u obtenerse de forma sintética. Su característica fundamental es que sus unidades están mayormente desacetiladas, lo cual influye en sus propiedades químicas y biológicas. Constituye uno de los pocos polímeros naturales catiónicos que se conoce. Es soluble en disoluciones acidas diluidas, y manifiesta una potente actividad antimicrobiana.

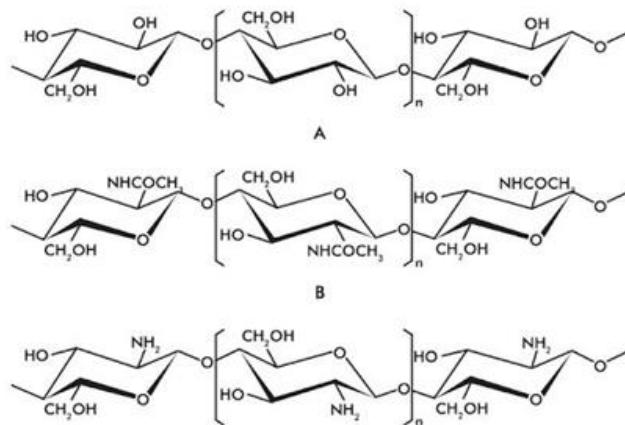


Figura 2. Representación de las cadenas de (A) celulosa; (B) quitina totalmente acetilada y (C) quitosana totalmente desacetilada, para evidenciar su similitud estructural.

Quitosano

El quitosano, es un polisacárido que se obtiene de la quitina parcialmente desacetilada y es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, es un copolímero lineal formado por unidades de glucosamina y en menor medida de N-acetil D-glucosamina unidos por enlaces β (1-4). Está presente en la pared celular de hongos, levaduras y en el exoesqueleto de los invertebrados como cangrejos e insectos. Algunas propiedades de la quitosana como son: la habilidad de enlazarse con sustancias cargadas negativamente tales como lípidos, proteínas, colorantes, entre otras; así como su comportamiento como floculante, adherente y adsorbente, adicionales a las reacciones típicas de las aminas. Una propiedad también importante de la quitosana es su estructura rígida, caracterizada por numerosos enlaces por puentes de hidrógeno, la cual le confiere una buena estabilidad térmica. De acuerdo a Sugimoto (1999), se descompone aproximadamente a 170°C y se degrada antes de fundir. El quitosano es una modificación de la quitina y posee mejores propiedades de reactividad y solubilidad. [06]

Obtención del quitosano

Se han desarrollado varios procedimientos para la obtención de quitosano en los últimos años. El método más utilizado es la reacción de conversión de quitina en este polisacárido natural principalmente por N-desacetilación alcalina. Dicho proceso se realiza mediante el tratamiento directo de la quitina con una solución concentrada de hidróxido de sodio o potasio (40-50%) a una temperatura de 100°C o más, con hidrólisis de la mayoría o todos los grupos acetilos del polímero. Otro de los procedimientos de obtención de este polímero, es también la desacetilación de la quitina por medio del uso de reactivos ácidos; sin embargo, este método puede provocar la hidrólisis del polisacárido y traer como consecuencia, bajos rendimientos del producto final (quitosano).

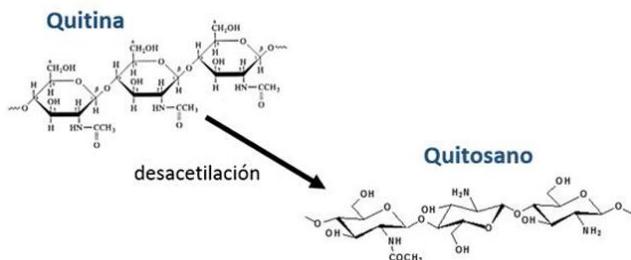


Figura 3. Desacetilación de la quitina.

Por esta razón, los métodos alcalinos son los procesos comúnmente empleados para la desacetilación de la quitina. Los grupos N-Acetilo (-NHCOCH₃) no pueden ser hidrolizados por reactivos ácidos, pues pueden provocar la hidrólisis del polisacárido, luego, los métodos alcalinos siendo más “suaves” resultan más comunes en la desacetilación de la quitina. Se ha comprobado que existe una relación lineal entre la temperatura y el grado de desacetilación en el intervalo entre 40-150°C. [07]

Actividad antimicrobiana del quitosano

El quitosano muestra su actividad antibacteriana solamente en un medio ácido, el cual es usualmente atribuible a su poca solubilidad a pH altos. Se han reportado actividad antimicrobiana que podría ser efecto de quitosano disuelto en medios ácidos tales como ácido acético, (Devlieghere y col. 2004), ácido láctico (Papineau y col. 1991), ácido glutámico (Roller y Covill, 1999; Sudharshan y col. 1992) y ácido clorhídrico (Chung y col. 2003). Los grupos amino catiónicos del quitosano probablemente envuelven a los grupos aniónicos de los microorganismos, resultando en la inhibición del crecimiento bacteriano. Otros mecanismos mencionados en la literatura son la interacción de productos hidrolizados difundidos con ADN microbiano, lo cual conduce a la inhibición del RNA mensajero y a la síntesis de proteínas y la quelación de metales, elementos esporulados y nutrientes esenciales. [08]

Oligómeros de quitosano

El estudio de los oligómeros no sólo ha abierto nuevos campos en la investigación del quitosano, sino que también nos permite entender mejor las propiedades fisicoquímicas de sus polímeros. En el caso del quitosano, el estudio de sus propiedades se encuentra restringido a su solubilidad en agua en un rango de pH de 2 a 6 y también a su viscosidad a concentraciones altas (Rupley, 1964). En algunos trabajos se describe la preparación de los oligómeros de D-glucosaminas libre de grupos acetilos, a partir de la hidrólisis parcial del quitosano, estos oligosacáridos (hidroclorados) no pueden ser cristalizados, pero a partir de ellos es posible obtener quitosano con bajo contenido de grupos acetilos. [08] Al ser un polímero que puede estar sujeto a la despolimerización produciendo quitosano de bajo peso molecular,

oligosacáridos (quito-oligómeros) y monómeros, sus aplicaciones son numerosas y variadas.

Existen varios métodos químicos, físicos y enzimáticos (quitosanasas, lisozimas) para la preparación de oligoquitosanos. La quitosanasa es una enzima específica para el quitosano, rompiendo sus enlaces glucosídicos β -(1,4) entre las unidades de glucosamina del polímero y reduce su peso molecular, produciendo así oligómeros de quitosano y eventualmente glucosamina, de acuerdo al grado de hidrólisis.

Por otra parte, la lisozima es otra enzima que rompe los enlaces β -(1,4)-glucosídicos en las unidades de N-acetilglucosamina; ésta contribuye a la despolimerización del quitosano y produce oligosacáridos o monosacáridos más pequeños; se utiliza generalmente en aplicaciones donde se desea obtener quitosano de bajo peso molecular. Dependiendo del tipo de degradación también se pueden introducir grupos funcionales como los aldehídos al eliminar grupos acetilo, resultando en formación de glucosamina y ácido acético y por lo tanto, modificando la estructura del polímero. [09] Los medios químicos se limitan a una hidrólisis ácida con métodos de calentamiento tradicional, la hidrólisis mediante ácido clorhídrico concentrado ha sido modificada trabajando con una concentración del 35% a 80°C por corto tiempo. La reacción del ácido nitroso con el quitosano es selectiva, rápida y fácilmente controlada con buena estequiometría. El peróxido de hidrógeno también puede ser usado para despolimerizar el quitosano, la preparación de oligo quitosanos por tratamiento de H₂O₂ es de fácil disponibilidad y ecológicamente amigable; sin embargo, la despolimerización también puede ser lograda con tecnología microondas asistida por la adición de sales bajo condiciones de reacción homogénea que produce quitosano de bajo peso molecular en corto tiempo. [08]

Caracterizaciones Espectroscopía FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

Técnica que mide la absorbancia o transmitancia de una muestra, absorbe luz infrarroja en diferentes longitudes de onda, proporcionando información sobre la composición química de la muestra. Por medio de esta técnica de caracterización se pueden identificar materiales, estudiar su estructura molecular, analizar las interacciones moleculares, entre otros. Para la preparación, la muestra debe mezclarse con KBr, para formar una pastilla transparente al IR y se analiza en el espectrómetro FTIR. El software analiza e interpreta los datos en un espectro; los picos que se presentan corresponden a grupos funcionales específicos. [10]

Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman es otra técnica de caracterización, dicha técnica fotónica proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico; se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático, una pequeña porción de la luz es dispersada elásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independientes de la frecuencia de la luz incidente. En esta técnica, no se necesita ningún tipo de preparación especial de la muestra, se realiza directamente sobre el material, además que, no conlleva a ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, esto quiere decir que es no-destructiva.[11]

Sustitutos dérmicos antimicrobianos

En un estudio hecho en dos hospitales del ISSSTE en Guerrero, se pudo determinar la frecuencia de infecciones intrahospitalarias donde se destacaron las bacterias Escherichia Coli, Staphylococcus epidermidis y Enterococcus faecalis; de acuerdo al mismo artículo, se concluyó “Los resultados se deben a la gran variedad de bacterias a las que está expuesto el paciente hospitalizado y más si el tiempo es prolongado; sin embargo, la posibilidad de exposición que conduce a la infección depende tanto de las características de las bacterias (resistencia a los antibióticos, virulencia y cantidad de material infeccioso) como del paciente (estado inmunológico, enfermedades concomitantes, etc.). Las bacterias han adquiriendo mayor resistencia, volviéndose multirresistentes a los antimicrobianos. Al observar la respuesta de cada bacteria frente a varios antibióticos se contribuyó a una elección mejor del tratamiento para el paciente.”

Hoy en día existen empresas que diseñan apósitos para quemaduras y heridas infectadas o con riesgo de infección, aunque es necesario de varios tratamientos o la ayuda de un refuerzo para poder eliminar por completo la actividad bacteriana, entre ellas están Derma Sciences Medihoney (apósito de miel para heridas infectadas), Chitogel, Xela, entre otros.

Consideraciones clínicas

Que sea biocompatible y logre imitar la estructura de la piel natural para integrarse y cumplir su función y evaluar su eficacia contra bacterias, considerar como se aplicará el sustituto dérmico y evaluar la capacidad del material para integrarse con el tejido.

Monitorear al paciente por si existe un caso de reacción adversa local o sistemática, incluyendo infecciones o alergias y estudiar cómo afecta a la velocidad y calidad de la cicatrización de heridas.

Beneficios de los sustitutos dérmicos antimicrobianos

- Reducción de la incidencia de infecciones: Los materiales antimicrobianos ayudan a prevenir la proliferación de bacterias y otros microorganismos en la herida, lo que reduce el riesgo de infección y promueve una cicatrización más rápida.
- Aceleración de la cicatrización de heridas: Los sustitutos dérmicos antimicrobianos están diseñados para estimular el proceso de cicatrización de la herida al proporcionar un entorno ideal que favorece la migración y proliferación de las células responsables de la reparación de la piel.
- Mejora de la calidad de vida del paciente: Al promover una cicatrización más rápida y reducir el riesgo de infecciones, los sustitutos dérmicos antimicrobianos pueden mejorar la calidad de vida de los pacientes al disminuir el dolor y el malestar asociados con las heridas.
- Mayor eficacia en el tratamiento de heridas crónicas y agudas: Los materiales antimicrobianos son especialmente útiles en el tratamiento de heridas crónicas, como úlceras por presión, úlceras venosas o úlceras diabéticas, que son propensas a infecciones recurrentes.

Capítulo 3.

DESARROLLO

Materiales

El quitosano de peso molecular medio (quitosano 84% desacetilado, viscosidad 525 cps, peso molecular de 190,000-310,000) y de peso molecular bajo (quitosano 76% desacetilado, viscosidad 94 cps, peso molecular de 50,000-190,000) se obtuvo de Aldrich. El peróxido de hidrógeno al 29-32% (H_2O_2 , estabilizado) se compró en J.T Baker con un peso molecular de 34.01. El ácido acético (libre de aldehído) es también un reactivo de J.T Baker, con un peso molecular de 60.05 (CH_3COON). Las perlas de hidróxido de sodio ($NaOH$) se obtuvieron de Macron Fine Chemicals con un peso molecular de 40.00. El peryodato de sodio (reactivo al 99.8%) se obtuvo de Aldrich con un peso molecular de 213.89. Todos los demás productos químicos eran de grado analítico y son de las marcas: Meyer, Aldrich, Baker. Se utilizó agua destilada para preparar todas las soluciones.

Se trabajó así mismo con hornos de vacío y de temperatura, una máquina de centrifugación que permitió centrifugar y separar los oligómeros que precipitaron y una liofilizadora que permitió recuperar los oligómeros de lo congelado.

Metodología

Se trabajó con dos diferentes métodos (periyodato de sodio y H₂O₂) de los cuales al final se obtuvieron 6 mezclas diferentes utilizando: quitosano de peso molecular bajo, quitosano de peso molecular medio y ácido hialurónico.



Quitosano: de acuerdo con la metodología de Tao Sun, para ambos quitosanos se preparó una solución para su degradación disolviendo 2 gramos de quitosano en 100ml de solución de ácido acético al 2%. Posteriormente se colocó en un agitador magnético para comenzar la agitación y se mantuvo así por 24 horas. Después se añadió 10ml de H₂O₂ a la solución del quitosano y se realizó un pre-equilibrio calentando la solución en un baño de agua a una temperatura de 80°C por 4 horas, para aumentar el movimiento molecular y facilitar la reacción iniciando así la degradación oxidativa del quitosano. El peróxido de hidrógeno es un agente oxidante que al formar radicales libres ataca los enlaces del quitosano provocando así que se rompan y de la misma forma que reduzca su peso molecular.

Cuando la solución quedó a temperatura ambiente, se ajustó el pH a 10 con una solución de NaOH 5M, siendo indispensable este paso pues así se neutraliza el medio ácido y se detiene la reacción de degradación. Tras haber ajustado el pH, se filtró colocando un papel filtro en un embudo de Büchner de presión reducida separando así las partes insolubles, a lo recuperado se le agregó etanol al 96% a un volumen de 3:1 (habiéndose comenzado con 100ml se le añadieron 300ml). El etanol es prácticamente un solvente orgánico que ayuda a reducir la solubilidad del

quitosano degradado en agua y permitirá recuperar el quitosano degradado en forma de polvo o partículas sólidas.

Se dejó en reposo 24 horas y se realizó un proceso de centrifugación a la solución donde una vez obtenido todo el precipitado, éste se lavó 3 veces con agua destilada para reducir el exceso de etanol. Después se guardó en tubos y se metió a congelar para posteriormente secar por liofilización.

Ácido hialurónico: se preparó una solución para la degradación del ácido hialurónico siguiendo la misma metodología que el quitosano excepto que se disolvieron 2gr de ácido acético en 100ml de únicamente agua destilada, dado a que a diferencia del quitosano el ácido hialurónico es soluble en agua y no es requerido el ácido acético para disolver y estabilizar; se realizó el proceso de agitación a la solución por 24 horas. Posteriormente se añadió 10ml de H₂O₂ al 30% a la solución de ácido hialurónico y se realizó el pre-equilibrio calentando la solución en un baño de agua a una temperatura de 80°C por 4 horas.

Cuando la solución quedó a temperatura ambiente, se ajustó el pH a 10 con una solución de NaOH 5M. Tras haber ajustado el pH, se filtró colocando un papel filtro en un embudo de Büchner de presión reducida, a lo recuperado se le agregó etanol al 96% a un volumen de 3:1 (habiendo comenzado con 100ml se le añadieron 300ml).

Se dejó en reposo 24 horas y se realizó un proceso de centrifugación a la solución donde una vez obtenido todo el precipitado, éste se lavó 3 veces con agua destilada para reducir el exceso de etanol y el sobrenadante se tiró junto con los desechos. Después se guardó en tubos y se metió a congelar para posteriormente secar por liofilización.

Cabe destacar que al menos este proceso se repitió dado a que, consultado con el asesor, fue posible que en el sobrenadante tuviéramos presente ácido hialurónico oxidado y se estuviera desecharlo, por lo que se repitió el proceso. Al sobrenadante se le realizó un proceso de evaporación y se calentó a 70°C para eliminar el etanol, de aproximadamente 250ml de volumen inicial se redujo a 20ml, inicialmente se pensó en liofilizar este residuo pero se decidió meterlo a vacío para eliminar el agua remanente, el calentamiento fue intermitente a 60°C. Finalmente se obtuvo un líquido amarillento y viscoso que no se redujo más y que resultó con un pH arriba de 12.

Peryodato de sodio

Quitosano: de acuerdo con el método de Yunpeng Cai, para el quitosano de peso molecular bajo se preparó una solución de 100ml de ácido acético al 2% (agua desionizada), a éste se añadieron 3.8gr de QPMB (2.5mmol) se dejó en agitación magnética por 24 horas para lograr la completa disolución. Transcurridas las 24 hrs se inició la oxidación con peryodato, se pesaron 0.54 gr de peryodato de sodio (2.5 mmol) y se disolvió en 5ml de agua desionizada. La reacción debe mantenerse en obscuridad y realizarse de manera controlada por lo que se cubrió la solución de quitosano con aluminio y se le añadió por goteo. Se dejó reaccionar por 2 horas. Una vez cumplidas las dos horas, se añadió 1ml de etilenglicol para detener la reacción y se dejó en agitación una hora más, al finalizar se guardó en tubos para meter a congelar y luego secar por liofilización.

Para el de peso molecular medio se repitió el mismo proceso pero, posterior a las 24hrs las cuales se debía quedar en agitación tras añadirse a los 100ml de ácido acético al 2%, se notó que la mezcla quedó muy viscosa que no pudo quedar completamente homogénea y no se

podía agitar magnéticamente, por lo que se agitó mecánicamente y además se le añadió otros 100ml de ácido acético al 2% para lograr la disolución completa. Se le añadió el peryodato para iniciar la oxidación. Se disolvieron 0.54 gr de peryodato de sodio (2.5 mmol) en 5ml de agua desionizada; la solución de peryodato se añadió por goteo y se dejó reaccionar en oscuridad por 2 horas.

Una vez cumplidas las dos horas, se añadió 1ml de etilenglicol para detener la reacción y se dejó en agitación por una hora, al finalizar se congeló en tubos para posteriormente secar por liofilización.

Ácido hialurónico: Se disolvió 1gr de ácido hialurónico (2.5mmol) en 100 ml de agua desionizada para iniciar su degradación y se dejó 24 horas en agitación. Posterior a las 24 horas se inició con la reacción de oxidación. Se envolvió el vaso con aluminio para que éste estuviera en oscuridad, se pesaron 0.54 gr de peryodato de sodio (2.5 mmol) y se disolvió en 5ml de agua desionizada; se le añadió por goteo a la solución de ácido hialurónico y se dejó reaccionar por 2 horas. Esto para que las moléculas de peryodato puedan efectuar con la oxidación y por la luz no se rompan enlaces que dañen o deterioren el proceso o reacción de oxidación.

Una vez cumplidas las dos horas se añadió 1ml de etilenglicol para detener la reacción, se dejó en agitación por una hora más y al finalizar se guardó en tubos para meter a congelar y luego secar por liofilización.

Tabla 1. Comparación de resultados de pH.

Muestra	pH inicial	pH final
Ácido hialurónico (H_2O_2)	3.6 (posterior al H_2O_2 y antes de subirle pH)	9.59 (pH final tras añadirle etanol 3:1)
Quitosano peso molecular bajo (peroxidato)	4.2 (previo a añadirle el peroxidato de sodio)	4.2 (pH final tras etilenglicol)
Quitosano peso molecular medio (peroxidato)	3.8 (previo a añadirle peroxidato y antes de etilenglicol)	3.6 (pH final tras etilenglicol)

Las mezclas fueron puestas en la liofilizadora aproximadamente 3-4 días, alcanzando un valor de 0.024 minibares para poder reducir todo lo{ líquido colectado en los tubos.

Pruebas experimentales

Se llevaron a cabo 2 pruebas experimentales verificando antes de la caracterización si se obtuvieron los oligómeros de quitosano. En la primera prueba con lo obtenido del método de peroxidato se diseñaron películas; se disolvieron 50mg de ambos en 5ml y se metieron a un horno de vacío a 60inHg, tras 24hrs se retiró y a las películas obtenidas se les hizo una prueba de solubilidad, esto quiere decir que si la película se disolvía en el agua destilada se cumplía el objetivo de ser soluble.

Para la segunda prueba se realizó una combinación de lo obtenido del ácido hialurónico con el quitosano para cruzar ambos materiales, donde usando 25mg en 2.5ml de agua destilada de cada uno siendo un total de 50mg y 5ml; algo que no se esperaba era que ambos tuvieran

cargas opuestas por lo que cruzar sus partículas de esta manera no fue posible, de manera alternativa se decidió realizar este cruce de dos maneras diferentes.

Para poder tener una película que tuviera ambos componentes, se realizaron más películas de QPMM y QPMB (50mg en 5ml de agua destilada) pues con éstas se realizó una prueba donde:

- Películas de QPMM y QPMB se cubrieron por completo en una disolución de AH (50mg en 5ml) en un molde para después meter en un horno a vacío y 60°C obtener otra película.
- Películas de QPMM y QPMB se dejaron expandir en agua destilada (1:08 y 1:23min respectivamente) para después cubrirlas en un molde con una disolución de AH (50mg en 5ml) para después meter en un horno a vacío y 60°C, la diferencia con el anterior método es que al expandirse la película de Quitosano se permite que el AH se abra paso en las capas de la película y pueda existir una mejor adición.

Así mismo, se diseñaron las pastillas con KBr para las pruebas FTIR, se pesaron 1gr de cada una de las muestras liofilizadas y aproximadamente 110gr de KBr el cual nos ayudará a tener una imagen clara y precisa para la prueba de FTIR.

Capítulo 4.

RESULTADOS

Después de retirar los tubos (siendo unos 14 en total) obtenidos de la liofilizadora y dejarlos en reposo 3 días, dos de los tubos comenzaron a degradarse por lo que de acuerdo con lo platicado y consultado se tornó en otro color debido a la luz, es decir, en el método de Cai, el etilenglicol utilizado para detener el proceso oxidativo del peryodato de sodio no tuvo efecto alguno y es posible que siguiera, en un proceso muy lento, oxidándose.

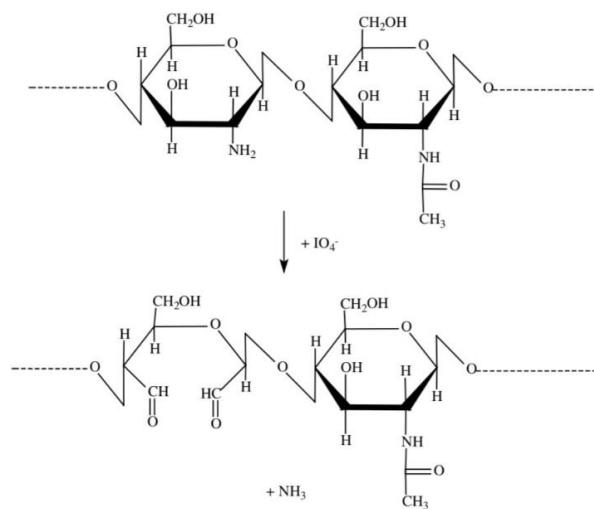


Figura 4. Efecto del peryodato en el quitosano de acuerdo a los artículos

La teoría nos decía que al añadirle el peryodato, la cadena larga existente del quitosano se rompía cumpliendo el efecto de despolimerización buscado pero de acuerdo a la imagen no se ven símbolos ni efecto del yodo, aunque ese NH_3 es un “ácido” resultante de la reacción.

Monitoreando los tubos tras los tubos durante los días siguientes, se observó que otros más se tornaron de un color “café” o ”rojo” e incluso al abrir los tubos éste olía a yodo, claro este siendo un resultado alterno a lo buscado se puede decir que, al igual que la povidona yodada que es usada en cirugías, con lo obtenido tenemos ya un común desinfectante antimicrobiano combinado con nuestros oligómeros.



Figura 5. Tubos obtenidos de la liofilizadora

Para las pruebas de solubilidad se pudo observar una pequeña diferencia entre el quitosano de un tono color “amarillo” a diferencia del que parecía tener un exceso de yodo; tenían una viscosidad diferente, al disolverse un tono diferente y al retirar las películas del horno las que tenían el exceso de yodo se quebraban fácilmente.

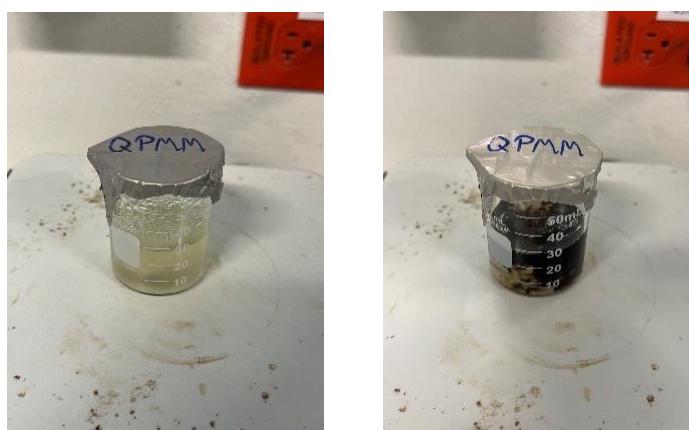


Figura 6. Diseño de las películas.

Tabla 2. Datos recolectados de los tubos y el pH de las pruebas de solubilidad

Sustancia	Recuperado (mg)	pH (prueba de solubilidad)
Ácido hialurónico (H_2O_2)	22	-
Quitosano peso bajo (H_2O_2)	4.5	-
Quitosano peso medio (H_2O_2)	24.3	-
Ácido hialurónico (peroxidato)	1580	6.2
Quitosano peso bajo (peroxidato)	3337	5.1
Quitosano peso medio (peroxidato)	1598	4.9

Se comprobó que los oligómeros obtenidos y el ácido hialurónico oxidado eran solubles en agua, por lo que al realizar el cruce entre los materiales las películas que se pudieron obtener fueron más sencillas de manipular a comparación del resto.



Figura 7. Películas de las pruebas con el ácido hialurónico

Para la espectroscopía FTIR y RAMAN se discutirá y mostrará únicamente los resultados del quitosano de peso molecular medio pues consultado con el asesor fue el que mayor grupos funcionales y presencia de enlaces tuvo en el método de peryodato. De acuerdo con las variables utilizadas, sugiriendo una reproducibilidad fiable en el método de síntesis y caracterización implementados, a continuación, se presentan los resultados de caracterización de la pastilla diseñada con KBr.

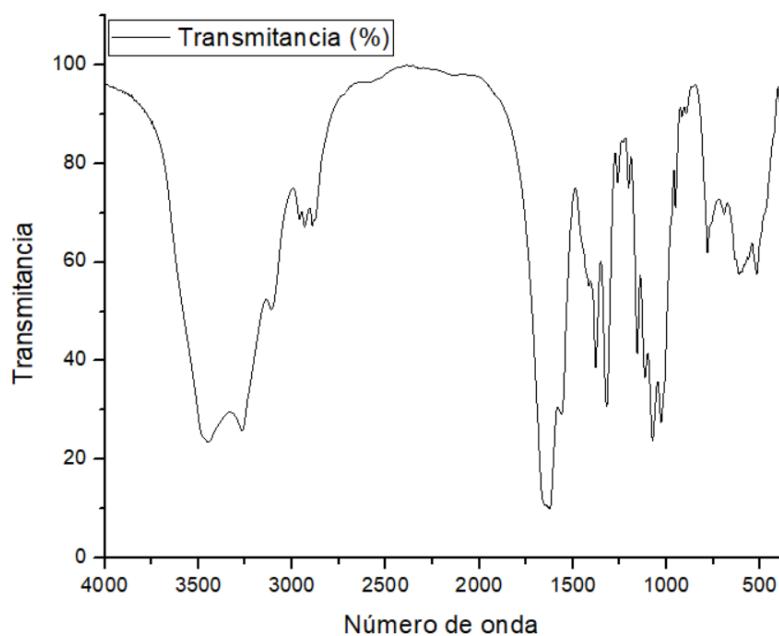


Figura 8, Espectroscopía FTIR de los oligómeros de quitosano de peso medio

Se pueden observar picos de transmitancia característicos los cuales indican una mínima presencia de ciertos grupos funcionales específicos en los oligómeros, un pequeño pico de la banda amida II cerca de los 1550 cm⁻¹, junto con una banda de estiramiento de C-H en los 1300cm⁻¹, un enlace C-O-C en los 1050cm⁻¹, un pico de C-H en los 3000cm⁻¹ y O-H en 3400cm⁻¹.

Para las pruebas de RAMAN, con las películas diseñadas se obtuvieron los siguientes resultados.

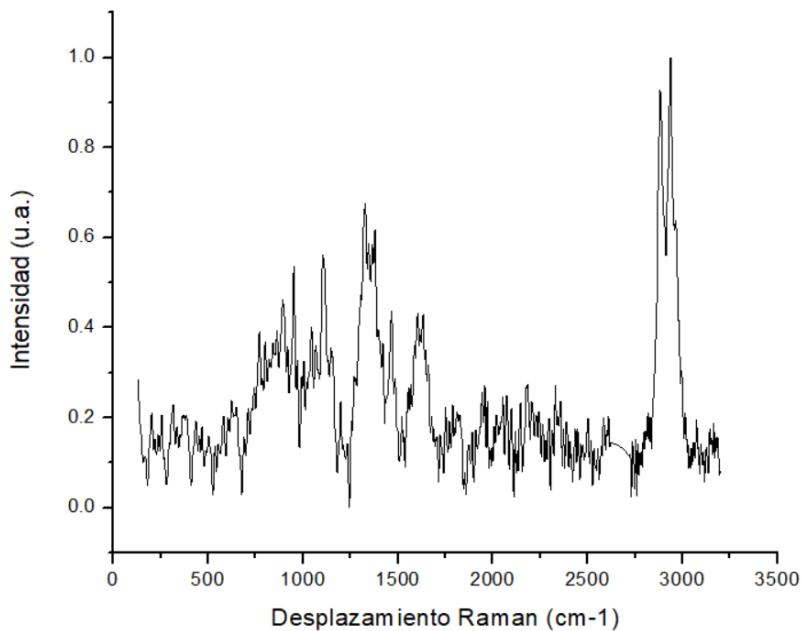


Figura 9. Espectroscopía RAMAN de los oligómeros de quitosano de peso medio

Se observa un pico intenso en la región de 2900, el cual está asignado generalmente a las vibraciones de estiramiento C-H de los grupos de metileno; de la misma forma se observan picos en las regiones de 800, 1000 y 1500 correspondientes a las vibraciones de glucosamina del quitosano.

Cabe destacar que aunque visualmente se puede observar la presencia de yodo en el material, en ninguna de las pruebas se pueden encontrar picos que demuestren que exista yodo, no hay enlace alguno. Al menos en las pruebas de FTIR no iba a ser posible analizarlo pues si existiera algún enlace de yodo con carbono o algún se encontraría por los 400cm⁻¹ y el límite de la gráfica es de 500cm⁻¹, sin embargo en el RAMAN teniendo un límite menor a 500 no se puede ver un pico que represente la presencia de algún enlace de yodo en el material, ni siquiera ese NH₃ que el artículo incluye.

Capítulo 5.

CONCLUSIONES

El objetivo de la investigación se basó en la preparación y obtención de oligómeros de quitosano a partir de la degradación oxidativa del mismo para posteriormente ser implementado en mezclas poliméricas de ácido hialurónico con el fin de encontrar nuevas aplicaciones en la medicina regenerativa; se busca la aplicación potencial de dichos resultados como un sustituto dérmico. Se cumplieron satisfactoriamente los objetivos planteados, pues se llevó a cabo el desarrollo y síntesis de los oligómeros de quitosano con las características y parámetros controlados y apegados a la metodología utilizada (Tao Sun y Cai), la cual se centra en la degradación oxidativa del quitosano.

La metodología ha demostrado ser muy efectiva pues en ambas existe una oxidación, sin embargo el método de Cai con el periyodato de sodio obtuvo mejores resultados; una observación durante la investigación fue la relación entre el tiempo de exposición de los oligómeros de quitosano en el baño de agua a 80°C y el rendimiento de la obtención; comprobé que en un tiempo de exposición menor resulta en que se obtiene una mayor cantidad de oligómeros. Otro de los aspectos fue la precisión en los volúmenes de los reactivos; así como el control del pH donde todas las pruebas debían ajustarse de un valor ácido (aproximadamente entre 3 – 4) al valor básico de 10; esta etapa implicó hacer pruebas para el lograr equilibrar el pH; sin embargo, durante el desarrollo de las muestras se presentaron

fluctuaciones muy abruptas del NaOH cada vez que se agregaba una nueva proporción a la solución, lo que requería estar en agitación constante para su estabilización. De estos desafíos entendí la importancia de tener un monitoreo regular y controlado de las condiciones de reacción, registrar los resultados y tiempos de reacción, síntesis, etc., para ajustar los parámetros del proceso en cada prueba.

En la etapa de caracterización comprendí mucho mejor el comportamiento y propiedades de los oligómeros de quitosano y las mezclas poliméricas; se usaron distintas técnicas de caracterización, y además de los aspectos que mencioné anteriormente, aprender a utilizar e interpretar los equipos de caracterización es también una faceta importante en la formación científica. Se amplió mi conjunto de competencias gracias al manejo de equipos de caracterización como fueron: FTIR y RAMAN.

Cabe destacar que aún queda mucho por definir y mejorar del material, así mismo es necesario realizar las pruebas de hemocompatibilidad las cuales aún no se ha decidido si se mandará a Ciudad de México para verificar o se probará con las muestras que se encuentran en el CICY. De la misma forma la prueba experimental con pacientes con heridas de quemaduras o heridas en la epidermis no tan profundas, claro que se hará una selección de la población que cumpla las características, que también deben ser definidas, y verificar su proceso de curación y cicatrización.

REFERENCIAS

- [01] Tomás, A., Villermo, A. (2020) Proyecto Final de Ingeniería Química, obtención de oligómeros de quitosano a partir de crestas de gallo. Facultad de Química, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica Nacional.
- [02] Mary C., James Mc. (2015) The content and size of hyaluronan in biological fluids and tissues. *Frontiers in immunology*.
- [03] Shital D., Sachin S. (2018) Extraction, purification, and characterization of hyaluronic acid from rooster comb. Applied Natural Science Foundation.
- [04] C. Lárez Velásquez, “Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro,” 2006. [Online]. Available: www.saber.ula.ve/avancesenquimica.
- [05] M. Rinaudo, “Chitin and chitosan: Properties and applications,” *Prog Polym Sci*, vol. 31, no. 7, pp. 603–632, Jul. 2006, doi: 10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2006.06.001.
- [06] A. T. Rodríguez-Pedroso, ; M A Ramírez-Arrebato, L L Barrera-Necha, and ; S Bautista Baños, (2017) “Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. vol. 15, no. 3, pp. 307–317.
- [07] Z. Mármol, E. Gutiérrez, G. Páez, J. Ferrer, and M. Rincón, “Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón”.
- [08] Cable C. (2013) “estudio de la obtención de oligo quitosano y su aplicación en películas de quitosano/oligo quitosano para la preservación de alimentos. Universidad Nacional del Sur.
- [09] Aranaz I & Castro (2018). On the ability of low molecular weight chitosan enzymatically depolymerized to produce and stabilize silver nanoparticles. *Biomimetics*, 3 (21), 3030021.
<https://www.mdpi.com/23137673/3/321>

- [10] Griffiths, P. R., & De Haseth, J. A (2007). Fourier Transform Infrared Spectrometry. John Wiley, Inc.
- [11] Pérez Pueyo, R. (4a. C.). Fundamentos de Espectroscopia Raman (1.a ed., Vol. 1).
<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6887/03Rpp03de11.pdf>
- [12] Espectroscopía de UV-Visible. (s. f.). Enlace UNAM - Innovación, tecnologías y servicios. Recuperado 7 de febrero de 2024, de <https://enlace.unam.mx/espectroscopia-de-uv-visible/>
- [13] Fundamentos de la Espectroscopia UV-visible moderna (2.a ed.). (1998). [Agilent Technologies]. Tony Owen
https://blog.utp.edu.co/docenciaedwin/files/2014/03/FUNDAMENTOS_UV_VIS_ESP_A%C3%91OL.pdf de
- [13] Martínez de la Cruz, L. (2020). Análisis térmico. Facultad de Química de la Universidad Autónoma México. Recuperado 7 de febrero de 2024,
https://quimica.unam.mx/investigacion/servicios-para-la-investigacion/usaii/analisis_termico/
- [14] Urea Ramos, E. (2020). Microscopía Electrónica de Barrido (SEM/FESEM). Universidad Almería. Recuperado 7 de febrero de 2024, de
https://www.ual.es/universidad/serviciosgenerales/stecnicos/microscopia/microscopia_electronica-de-barrido

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estructura del Ácido Hialurónico	10
FIGURA 2 – Representación de las cadenas de (A) celulosa; (B) quitina totalmente acetilada y (C) quitosana totalmente desacetilada, para evidenciar su similitud estructural.	13
FIGURA 3 – Desacetilación de la quitina	14
FIGURA 4 – Efecto del peryodato en el quitosano de acuerdo a los artículos	27
FIGURA 5 – Tubos obtenidos de la liofilizadora	28
FIGURA 6 – Diseño de las películas	28
FIGURA 7 – Películas de las pruebas con el ácido hialurónico	29
FIGURA 8 – Espectroscopía FTIR de los oligómeros de quitosano de peso medio	30
FIGURA 9 - Espectroscopía RAMAN de los oligómeros de quitosano de peso medio	31

LISTA DE TABLAS

TABLA 1 – Comparación de resultados de pH	25
TABLA 2 – Datos recolectados de los tubos y el pH de las pruebas de solubilidad	29

ANEXO 1

Liu, X., Yang, S., & Xu, Y. (2018). Periodate oxidation of chitosans with different chemical compositions. *Carbohydrate Polymers*, 181, 1096-1103.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.022>

Zhao, J., Jiang, T., & Wang, Y. (2020). A hyaluronic acid-based hydrogel enabling CD44-mediated chondrocyte binding and gapmer oligonucleotide release for modulation of gene expression in osteoarthritis. *Biomaterials*, 230, 119615.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119615>