



Escuela
Universitaria
Ingeniería
Técnica
Industrial
ZARAGOZA

PREPARACION Y CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE HIDROGELES DE QUITOSANO PARA SOPORTE DE CÉLULAS DE CARTÍLAGO

PROYECTO DE FIN DE CARRERA

Especialidad: Química Industrial

Autor: Javier Abadía Piquero

Tutores:

Dr. Fernando Navarro Gómez

Dr. Ignacio Ochoa Garrido



ciber-66n

Índice

1.-Introducción y Objetivos.....	6
Antecedentes	
2.- Métodos de obtención de quitina y quitosano.....	8
2.1.- Obtención de quitina.....	8
2.1.1.- Acondicionamiento de la materia prima.....	10
2.1.2.- Desproteínización.....	10
2.1.3.- Desmineralización.....	10
2.1.4.- Decoloración.....	10
2.2.- Obtención de quitosano.....	11
2.2.1.- Obtención de quitosano de langosta común.....	11
3.- Caracterización del quitosano y quitina.....	13
3.1.- Determinar el grado de acetilación\desacetilación.....	13
4.- Propiedades del quitosano.....	14
4.1.- Grado de acetilación	14
4.2.- Peso molecular y viscosidad.....	14
4.3.- Solubilidad.....	15
4.4.- Biodegradabilidad.....	15
5.- Aplicaciones del quitosano.....	16
5.1.- Aplicaciones biomédicas.....	16
Parte experimental	
6.- Proceso de obtención de hidrogeles de quitosano.....	17
6.1.- Introducción.....	17
6.2.- Preparación de las disoluciones de quitosano.....	18
6.3.- Neutralización de la disoluciones de quitosano.....	21

6.3.1.- Neutralización con NaOH acuoso.....	22
6.3.2.- Neutralización con NH ₃ gaseoso.....	23
6.3.3.- Neutralización con glicerofosfato disódico.....	24
6.4.- Endurecimiento.....	27
6.5.- Lavado.....	28
6.6.- Esterilización.....	30
6.7.- Materiales.....	30
7.- Proceso de caracterización de los hidrogeles de quitosano obtenidos.....	31
7.1.- Introducción.....	31
7.2.- Descripción de los experimentos mecánicos.....	32
7.3.- Tratamiento de datos mecánicos.....	34
7.4.- Discusión de los resultados de los ensayos mecánicos.....	40
8.- Ensayo de cultivo celular en los hidrogeles de quitosano obtenidos.....	45
8.1.- Introducción.....	45
8.2.- Preparación de los hidrogeles para el cultivo de células.....	45
10.- Conclusiones.....	47
11.- Bibliografía.....	49

1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La quitina se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, tanto en el reino animal como en el vegetal. De hecho es el segundo polímero natural más abundante, sólo superado por la celulosa, por lo que constituye un importante recurso renovable. Se argumenta que la quitina natural posee un grado de acetilación, DA, de 0,66, es decir, que una de cada tres de sus unidades se encuentran desacetiladas. Queda definido así el DA como la fracción del total de unidades glucosídicas que están acetiladas. A veces la composición se reporta en términos del grado de desacetilación, DD ($DD = 1 - DA$). En ocasiones estos valores se dan en tanto por ciento.

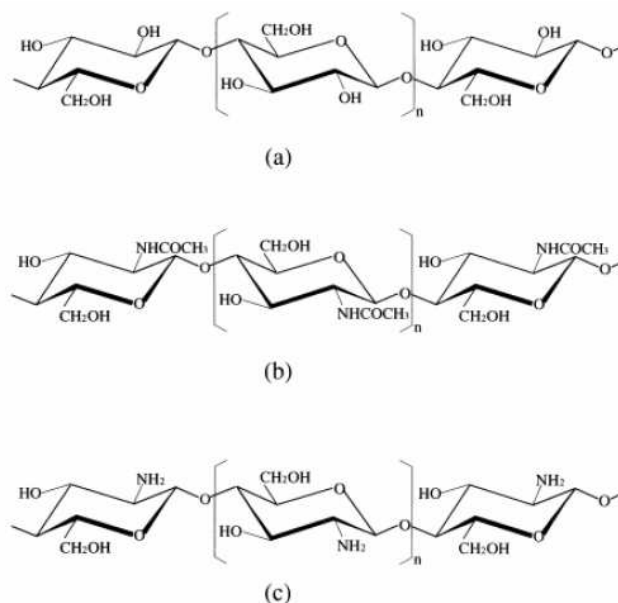


Figura 1.2 Representación esquemática de las cadenas de (a) celulosa; (b) quitina totalmente acetilada y (c) quitosano totalmente desacetilada. La similitud estructural entre ellas resulta evidente.

El quitosano es un polisacárido lineal que se obtiene por desacetilación extensiva de la quitina y está compuesto por dos tipos de unidades estructurales (N-acetil-D-glucosamina y la D-glucosamina) distribuidas de manera aleatoria a lo largo de la cadena. Estas unidades se encuentran unidas entre sí por enlaces del tipo $\beta(1 \rightarrow 4)$ glicosídicos. En la Figura 1.2 se muestra la estructura de una quitosano totalmente desacetilada. Sin embargo, resulta muy difícil desacetilar totalmente la quitina, y lo que usualmente se conoce como quitosano es una familia de quitinas con diferente grado de desacetilación, generalmente superior a 0,45.

En este proyecto se estudia los distintos métodos de gelificación de hidrogeles de quitosano para adaptarlos como soporte de células en aspectos relacionados con la ingeniería de tejidos del cartílago. Deben ser estables a corto plazo pero biodegradables a largo plazo en un medio fisiológico. Además, deben ser fácilmente manipulables y presentar ciertas características físicas en el medio fisiológico que permitan o favorezcan la aplicación de estos en la ingeniería de tejidos, con la particularidad de que sus hidrogeles son un buen sustrato alimenticio y son consumidos rápidamente durante el desarrollo de las células cultivadas.

En la formación del hidrogel de quitosano se estudian distintas fases: disolución de quitosano en un medio ácido, neutralización con distintos agentes básicos (Amoniac, NaOH y glicerofosfato), lavado para alcanzar pH neutro (condición para el cultivo) y endurecimiento tanto térmico como químico. Todo ello en condiciones para obtener geles estériles.

El quitosano utilizado en este PFC se encuentra en estado sólido por lo tanto se debe disolver para poder gelificarlo después. Se utilizaron dos ácidos: uno fuerte (HCl) y otro débil (ácido acético), como era de esperar la disolución fue más rápida en el caso del HCl. En ambos casos se calentó suavemente durante un tiempo corto para facilitar su disolución. Se pudo constatar visualmente que la degradación de las cadenas de quitosano es más acentuada en el caso de la disolución con HCl.

La neutralización en el caso de NH_3 y NaOH fue a temperatura ambiente, en estos casos la gelificación fue en el momento de neutralizar y luego se lavó para obtener los geles a pH neutro. En cambio la neutralización con glicerofosfato no produjo su gelificación ya que debía ser calentado para que gelificara. Según varios artículos [1] la temperatura de gelificación es 37-39°C aunque se puede observar que en este proyecto la temperatura de gelificación no era menor de 70 °C, esto es debido a que nuestro quitosano tenía un grado de desacetilación entre 75%-85%, y en la bibliografía utilizaba quitosano de grado de desacetilación del 95%. Para ajustar el pH neutro de los geles neutralizados con glicerofosfato se utilizó un pHmetro y un baño de hielo para impedir que gelificara. Al formar tampón el glicerofosfato (es una base débil) en la disolución, el trabajo de ajustar el pH era lento y pesado.

El lavado sólo se llevó a cabo con los geles neutralizados con amoniac y sosa cáustica, Los geles formados tenían un pH básico, se conseguía alcanzar el pH neutro cambiando el agua destilada de lavado cada vez que se saturaba. Esto se comprobaba con un papel tornasol y cuando alcanzaba un pH muy básico (12-14) se volvía a cambiar el agua de lavado.

El endurecimiento surgió debido a la necesidad de obtener geles con mayor resistencia mecánica (rigidez), se estudio dos métodos: uno térmico y otro químico. El tratamiento térmico consistió en introducir el gel ya neutralizado en un baño con agua destilada a 100°C durante 1 o 2 horas, sin conseguir aumentar significativamente sus propiedades mecánicas. El tratamiento químico se llevó a cabo en un baño de sosa al 20% durante 30 minutos a 1 hora. Este tratamiento resultó efectivo para endurecer considerablemente su rigidez como se muestra en el desarrollo del proyecto.

La esterilización se consiguió lavando los geles en condiciones estériles, ya que antes al tener un pH tan básico, no permitía que se desarrollara cualquier contaminante biológico (gérmenes, suciedad...).

Una vez disueltos, neutralizados, lavados y endurecidos (en los casos que se endureció) los geles estaban preparados para caracterizarlos por medio de un ensayo de compresión en una maquina Instron. Para ello de cada gel formado se obtuvo como mínimo 6 muestras, de las que se calculó el promedio con su error típico y desviación estándar de los módulos de tensión.

Con los resultados obtenidos de la máquina Instron se determinaba el modulo inicial además de otros datos relevantes por medio de un tratamiento matemático. En nuestro PFC el valor buscado de módulo inicial era de 0,4 Mega pascales, a lo largo del proyecto se determinó que daban un valor inferior al requerido, incluso cuando se endurecía por medios térmicos (calentando a 100°C durante 1-2 horas) o químicos (baño de NaOH al 20% durante 1 hora).

Por último se hizo un experimento tentativo de cultivo de células en el que se depositaron para estudiar su desarrollo. El resultado fue que se desarrollaron menos del 10% de las células depositadas, aunque el pH fuese neutro.

OBJETIVOS

El objetivo de este PFC es estudiar los procesos de gelificación de los hidrogeles de quitosano y su aplicación en la ingeniería de tejidos. Para que puedan aplicarse deben cumplir una serie de requisitos como de un pH =7 y una resistencia a la tensión (rigidez) de 400 kilo pascales (0,4 Mega pascales) en el modulo inicial. Estos hidrogeles biocompatibles, deberán de ser estables a corto plazo pero biodegradables a largo plazo en un medio fisiológico.

Estudiamos distintas concentraciones de quitosano y diferentes neutralizantes, en un esfuerzo para encontrar las condiciones más idóneas en la preparación de hidrogeles. Además se intenta conocer cómo afecta a su caracterización mecánica, consistencia y degradación, así como el efecto del almacenamiento.

En definitiva un principio de estudio para la futura aplicación del quitosano en la ingeniería de cartílago.

ANTECEDENTES

2.- MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE QUITINA Y QUITOSANO

2.1.- OBTENCIÓN DE QUITINA

La quitina comercial se extrae a partir de desechos de crustáceos de la industria pesquera, siendo las principales fuentes los caparzones de cangrejo, camarón, langostino y langosta. Las técnicas de extracción reportadas son muy variadas, pues dependen en gran medida de las características de la fuente, ya que como se aprecia en la Tabla 1.1, la composición del material de partida varía notablemente de una especie a otra. La mayor parte de las técnicas desarrolladas descansan en procesos químicos de hidrólisis de la proteína y la remoción de la materia inorgánica. Algunos incluyen un paso de decoloración de la quitina extraída, mediante una extracción con solvente o la

oxidación de los pigmentos remanentes. Estos métodos utilizan generalmente grandes cantidades de agua y energía, y con frecuencia dan lugar a desechos corrosivos. En la actualidad se investigan tratamientos enzimáticos como una alternativa prometedora. A tal efecto se han reportado procesos que utilizan extractos enzimáticos o enzimas aisladas y fermentaciones microbiológicas, pero aún sin la eficiencia de los métodos químicos, fundamentalmente en lo que respecta a la eliminación del material inorgánico [4].

Tabla 1.1 Composición química de algunas fuentes de materia prima para la obtención de quitina/quitosano [2].

Origen	Composición Química (%)				
	Humedad	Proteínas	Cenizas	Lípidos	Quitina
Caparazones de jaiba y cangrejo					
• <i>Callinectes sapidus</i>	46.8	7	38.5	0.4	7.3
• <i>Paralithodes camtschaticus</i>	50	11	23	0.5	15.5
• <i>Chionectes opilio</i>	---	10.3	57.9	1.35	26.65
Camarón (langostino)					
• <i>Penaeus spp.</i>					
Cabeza	77.04	12.9	5.2	2.06	2.8
Cáscara	65	22.1	9.2	0.5	6.2
Krill					
• <i>Euphasia superba</i>	---	41	23	11.6	24
Langosta					
• <i>Limulus trigonus</i>	13.5	17.0	54.7	---	---
• <i>Panulirus argus*</i>	11.8	11.0-14.0	55.0	---	10.6
Pluma de calamar					
• <i>Dosidicus gigas</i> (calamar gigante)	60	24.16	0.4	0.26	18.9
• <i>Loligo spp.</i> (calamar común)	50	32.75	0.25	---	17

[3]

En general los procesos de obtención de quitina se realizan mediante los siguientes pasos consecutivos: acondicionamiento de la materia prima, extracción de la proteína (desproteínización), eliminación de las impurezas inorgánicas (desmineralización), y decoloración de la quitina obtenida. A continuación se brindará una breve información sobre cada uno de estos procesos. Una descripción más detallada de los procesos de obtención de quitina y de quitosano se puede encontrar en la bibliografía [5-7].

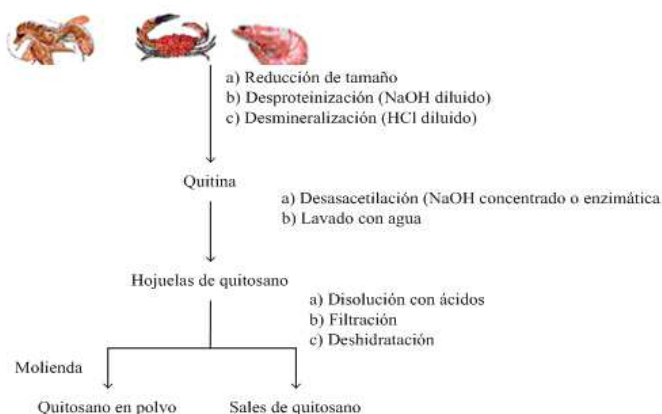


Foto 1.1.- Fases en la obtención de quitina y quitosano.

2.1.1.- Acondicionamiento de la materia prima

Consiste en el lavado con agua de los caparazones a procesar y separación de la masa que pueda quedar adherida a los mismos. Posteriormente se procede a su molienda hasta el tamaño de partículas adecuado para la extracción, que generalmente es de varios milímetros.

2.1.2.- Desproteínización

El procedimiento más comúnmente utilizado para desproteínizar consiste en tratar los caparazones de los crustáceos con una solución acuosa diluida de NaOH a temperatura más bien alta (65-100°C), con el fin de disolver la proteína. El tiempo de tratamiento suele variar entre media hora a 72 horas. En ocasiones se prefiere realizar dos tratamientos consecutivos por tiempos cortos. Hay que tener en cuenta que tratamientos por largo tiempo o a temperaturas muy altas pueden provocar ruptura de las cadenas y la desacetilación parcial del polímero. También se han utilizado otros agentes para extraer la proteína, entre los cuales se mencionan los siguientes: Na_2CO_3 , NaHCO_3 , KOH, K_2CO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Na_2SO_3 , NaHSO_3 , Na_3PO_4 y Na_2S [5].

Los procesos de desproteínización usando extractos enzimáticos o enzimas aisladas y fermentaciones microbiológicas se han probado con relativo éxito, pero la alternativa del tratamiento enzimático/microbiológico, además de consumir largo tiempo, suele dejar de 1-7% de proteína residual [8].

2.1.3.- Desmineralización

El principal componente inorgánico de los caparazones de los crustáceos es el CaCO_3 , el cual se suele eliminar empleando soluciones diluidas de HCl (hasta 10%) a temperatura ambiente, aunque también se han utilizado otros ácidos (HNO_3 , CHOOH , HNO_3 , H_2SO_4 , y CH_3COOH). La concentración del ácido y el tiempo de tratamiento dependen de la fuente, pero deben evitarse los tratamientos a temperaturas más altas, que provocan la degradación del polímero [5]. Un tratamiento alternativo para disminuir la degradación consiste en el empleo del agente acomplejante EDTA (ácido etilendiaminotetracético) [9].

2.1.4.- Decoloración

La coloración de los caparazones de crustáceos se debe fundamentalmente a la presencia de pigmentos tales como la astaxantina, la cantaxantina, el astaceno, la luteína y el β -caroteno. Los tratamientos anteriores generalmente no son capaces de eliminar estos pigmentos, los que suelen extraerse a temperatura ambiente con acetona, cloroformo, éter, etanol, acetato de etilo o mezcla de solventes [6]. También se han empleado agentes oxidantes tradicionales, como el H_2O_2 (0.5-3%) y el NaClO (0.32%), aunque debe tenerse presente que éstos suelen atacar los grupos aminos libres e introducir modificaciones en el polímero. En caparazones fuertemente coloreados, como el de la langosta común, se ha reportado la utilización exitosa de tratamientos con mezclas de acetona y NaOCl a temperatura ambiente [10].

2.2.- OBTENCIÓN DE QUITOSANO

La desacetilación de la quitina se lleva a cabo por hidrólisis de los grupos acetamida en medio fuertemente alcalino, a altas temperaturas. Generalmente la reacción se realiza en fase heterogénea empleando soluciones concentradas de NaOH o KOH (40-50%) a temperaturas superiores a 100°C, preferiblemente en atmósfera inerte o en presencia de sustancias reductoras como el NaBH₄ o el tiofenol para evitar la despolimerización del polímero. Las condiciones específicas de la reacción dependerán de diversos factores, tales como el material de partida, el tratamiento previo, y el grado de desacetilación deseado. No obstante, con un solo tratamiento alcalino, el máximo grado de desacetilación alcanzado no suele sobrepasar del 75 al 85%. Tratamientos prolongados suelen provocar la degradación del polímero sin traducirse en un aumento sensible del grado de desacetilación [11, 12].

Al igual que la celulosa, la quitina es un polímero semicristalino, de manera que cuando la desacetilación se realiza en fase heterogénea la reacción tiene lugar fundamentalmente en las regiones amorfas. La reacción en condiciones homogéneas permite una modificación más uniforme del polímero, y se realiza sobre *álcali quitina*. La misma se obtiene sometiendo una suspensión alcalina de quitina a tratamientos de congelación-descongelación hasta producir una solución acuosa de quitina en hidróxido de sodio [13]. La desacetilación homogénea se lleva a cabo a concentraciones de álcali más moderadas (alrededor del 30%), a 25-40°C por tiempos de 12 a 24 horas [14].

Se ha podido demostrar que mientras que los quitosanos obtenidos en el proceso heterogéneo presentan polidispersión en cuanto al grado de acetilación de sus cadenas, las obtenidas por vía homogénea tienen todos la misma composición [15].

En la actualidad se exploran otros métodos más novedosos para desacetilar la quitina con el uso de radiación con microondas [16] o de tratamientos termo-mecánicos [17], entre otros.

2.2.1.- Obtención quitosano de langosta común

Ya hemos mencionado antes que las plantas procesadoras de langosta común (*Panulirus argus*) generan una gran cantidad de residuos, fundamentalmente el cefalotórax, que constituye una fuente potencial de quitina y quitosano. Por esta razón diversos investigadores se han dedicado, desde hace más de 30 años, al desarrollo de métodos de obtención y caracterización de estos polímeros y a estudiar su aplicación en diversas esferas.

El método para la obtención de quitina que es objeto de esta invención consiste en utilizar los caparazones de langostas limpios, molidos y secos, tratarlos con etanol varias veces hasta lograr la eliminación total de los pigmentos, someter el material a sucesivas extracciones con hidróxido de sodio al 3% a - una temperatura entre 80 y 120°C y tratarlo con ácido clorhídrico 1N en frío. El sólido obtenido en la fase anterior se somete a purificación utilizando permanganato de potasio al 2% durante un tiempo de 10-12 horas y regenerando el material con bisulfito de sodio en medio ácido diluido o utilizando una corriente de cloro producido por reacción entre permanganato de potasio y ácido clorhídrico. Por último, se realiza una purificación final del producto mediante disolución en ácido clorhídrico concentrado y precipitación sobre agua fría, se

filtra al vacío, se lava y se seca. De esta manera se obtiene una quitina de color blanco hueso con un bajo contenido de cenizas ($\leq 0.2\%$) que se utiliza actualmente en diversas aplicaciones farmacéuticas y cosméticas.

En la Tabla 2.1 se muestra la influencia de distintos parámetros del proceso de obtención de quitosano a partir de quitina por medio varios tratamientos alcalinos [11]. De la tabla se desprenden dos conclusiones importantes: a) que existe un compromiso entre el grado de acetilación y el peso molecular finales, es decir, mientras mayor es la desacetilación alcanzada, menor es el peso molecular (muestras C a F), y b) que dos tratamientos consecutivos por corto tiempo son preferibles si se desea obtener una muestra más desacetilada, con menor afectación del peso molecular (muestras A y B). Como era de esperar, al disminuir la concentración de NaOH se obtienen mayores grados de acetilación para un mismo tiempo de tratamiento (comparar la serie D-F con la serie G-I).

Tabla 2.1 Características de las muestras de quitosano [11].

Muestra	Tiempo de hidrólisis (min)	Grado de Acetilación (%) ^a	$[\eta]$, dL.g ⁻¹	$M_v \cdot 10^4$
A	15 + 15	3.8	0.69	1.17
B	10 + 10	3.8	1.05	2.05
C	90	4.2	0.51	0.79
D	20	15.6	1.45	3.32
E	15	14.2	1.69	4.0
F	5	28.4	1.65	3.98
G	20	21.8	1.53	3.54
H	15	27.5	1.61	3.8
I	5	51.1	---	---

Tabla 2.2 Características de las muestras de quitosano obtenidas por hidrólisis de la quitina con NaOH al 50% durante 120 minutos [11].^o

Muestra	Temperatura (°C)	Grado de Acetilación (%) ^a	$[\eta]$, dL/g	$M_v \cdot 10^4$
J	60	28.9	1.62	4.0
K	80	17.1	1.38	3.1
L	100	13.7	1.26	2.7
M	120	5.7	0.73	1.3
N	140	3.8	0.73	1.3

El efecto de la temperatura de hidrólisis sobre ambos parámetros se reporta en la Tabla 2.2, donde se aprecia que la temperatura desempeña un papel análogo al del tiempo. Es decir, para un mismo tiempo de tratamiento, al aumentar la temperatura disminuye el grado de acetilación, pero también lo hace el peso molecular. Este compromiso, a tener en cuenta en el diseño de cualquier proceso de obtención de quitosano por hidrólisis alcalina, ha sido reportado también posteriormente por diversos investigadores [12].

Tabla 2.3 Condiciones de reacción en la obtención de quitina o quitosano [16].

Etapas	Proceso*	Conc. NaOH (%)	Conc. HCl (N)	Relación sólido: líquido	Temp. (°C)	Tiempo (min)
1	Acondicionamiento	Lavado y molido del cefalotórax a partículas de 0.5 a 2cm ²				
2	Desproteínización	0.5 - 2.0	----	1:3 - 1:10	40 - 100°C	30 - 60
3	Descarbonatación	----	1.0 - 2.0	1 : 5	Ambiente	30 - 120
4	Tratamiento Básico *	0.5 - 2.0	----	1:5 - 1:10	70 - 100	30 - 60
5	Desacetilación	45 - 50	----	1:6 - 1:10	80 - 90	30 - 120

*El tratamiento básico se realiza sólo si el producto final es la quitina.

Posteriormente se desarrolló un procedimiento rápido, sencillo y flexible en el cual se utiliza el desecho de langosta en su conjunto y puede obtenerse simultáneamente proteína con buenas características y propiedades funcionales para el consumo humano, y quitina o quitosano según se requiera, siendo posible recuperar además CaCl_2 , CO_2 y un extracto alcohólico con propiedades tensoactivas. El método es además ajustable a las características de la materia prima inicial y los requerimientos del polímero final, tales como grado de acetilación y peso molecular. En la Tabla 2.3 se muestran las condiciones generales reportadas en la bibliografía [18] para obtener quitina o quitosano a partir de cefalotórax de langosta fresco y húmedo.

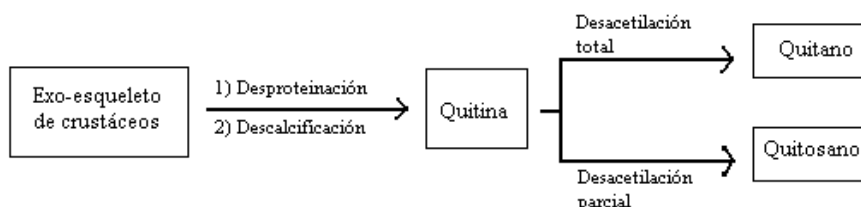


Foto 1.2.- Esquema de la obtención de quitosano y quitano a partir de esqueleto de crustáceos (como el camarón o la gamba).

3.- CARACTERIZACION DE LA QUITINA Y QUITOSANO

Tanto la composición de las cadenas de estos polímeros como sus dimensiones suelen variar en dependencia del material de partida y de la rigurosidad del método de obtención, por lo que la determinación del grado de acetilación y su masa molecular son dos parámetros de obligatorio conocimiento para caracterizar una muestra de estos polisacáridos, ya que ambas tienen una gran incidencia en sus propiedades. Otras características, tales como la polidispersidad de su masa molecular, el contenido de humedad, su solubilidad y el por ciento de cenizas son también interesantes. Para las aplicaciones en la alimentación, la medicina y farmacia, el contenido de metales pesados, endotoxinas y proteínas, entre otros, suelen ser objeto de determinación.

3.1.- DETERMINACIÓN DEL GRADO DE ACETILACIÓN /DESACETILACIÓN.

Se han desarrollado numerosos métodos para determinar el grado de N-acetilación de estos polímeros basados en diversas técnicas, entre las que se pueden mencionar la espectroscopia infrarroja [12], espectroscopia RMN de protón [19], la potenciometría [7] y la espectroscopia UV primera derivada [20,21]. Otras técnicas alternativas incluyen el análisis elemental [5], el análisis térmico [22] y la cromatografía de permeación de gel [23]. Estas técnicas se encuentran bien descritas en las referencias señaladas, además de estar revisadas en diversos libros [5, 21].

4.- PROPIEDADES DEL QUITOSANO

Las propiedades de la quitina y el quitosano dependen principalmente de la fuente de obtención y el método de preparación y estos polímeros difieren entre sí por su distribución, masa molecular y grado de acetilación.

4.1 GRADO DE ACETILACIÓN.

Químicamente, la quitina y el quitosano son poliglucosaminas que son distinguidas solamente por el grado de la acetilación de los grupos amino. Las quitinas típicas tienen generalmente grado de acetilación entre 70-95% que corresponde a un contenido de acetilo de un 15-20.7% mientras que los quitosanos tienen comúnmente un grado de acetilación entre 15-25% que corresponde 3.2 - 5.3 % del contenido de acetilo. El grado de acetilación es probablemente el parámetro más importante de estos polisacáridos y determina grandemente sus características funcionales y fisiológicas.

Los factores que afectan el grado de la desacetilación incluyen: concentración del álcali, tratamiento previo, tamaño de partícula, y la densidad de la quitina. Los últimos dos factores afectan el índice de penetración del álcali en la región amorfa y en cierto grado también en las regiones cristalinas del polímero, necesitadas para que la hidrólisis ocurra. En la práctica, el nivel máximo de desacetilación que se puede alcanzar en un solo tratamiento alcalino es cerca de 75-85%.

El grado de acetilación es muy importante para obtener un producto soluble, aunque también influye la distribución de los grupos acetilo.

4.2 PESO MOLECULAR Y VISCOSIDAD.

Otros parámetros importantes son el peso molecular y la viscosidad asociada. Como el quitosano es obtenido de la quitina por desacetilación alcalina, el peso molecular tiene un promedio más bajo al extenderse generalmente entre 1×10^5 - 3×10^5 Da. El quitosano exhibe una amplia gama de viscosidades en los medios ácidos diluidos que dependen principalmente de su peso molecular. La viscosidad relativa de los quitosanos de alta viscosidad es comparable con la viscosidad de las gomas guar o del tragacanto.

El quitosano es un producto altamente viscoso similar a las gomas naturales. La viscosidad puede variar de 10 a 5000cp. En solución, debido a su comportamiento polielectrolítico, en dependencia de la fuerza iónica del medio, se comporta de manera diferente, lo cual influye notablemente en la viscosidad de la disolución. Debido a la alta viscosidad del quitosano en sistemas de $\text{pH} < 5.5$ puede emplearse como espesante, estabilizante o agente de dispersión.[26,27].

La quitina microcristalina producida por hidrólisis controlada de ácido puede ser conveniente para el uso como estabilizante y espesante en alimentos. La viscosidad y la estabilidad de la emulsión de la quitina microcristalina es de 10 a 20 veces mayor que la de la celulosa cristalina lo que lo hace conveniente para los usos en mayonesa, mantequilla de cacahuete y otros alimentos tipo emulsión

4.3. SOLUBILIDAD.

Como en la quitina, el grado de cristalinidad y la estructura molecular son los factores dominantes de la solubilidad subyacente, la fuerza mecánica, y otras características funcionales del quitosano.

La solubilidad y la viscosidad del quitosano dependen del grado de desacetilación y degradación del polímero, pero también puede verse incrementada por la adición de formaldehído, cloruros de acilo, anhídridos de ácidos o sales de metales alcalinos. Esto es debido al entrecruzamiento de cadenas que da lugar a un polímero de mayor peso molecular; estas soluciones acuosas resultantes no pueden ser dispersadas ni disueltas por adición de agua.

Mientras que la quitina es insoluble en los solventes comunes, el quitosano es soluble en ácidos minerales y orgánicos diluidos. El quitosano no es soluble a $\text{pH} > 6.0$ y funciona solamente en sistemas ácidos, siendo una propiedad relevante para su aplicación en alimentos. Debido a la alta densidad de cargas positivas el quitosano se comporta en soluciones ácidas acuosas como una molécula policationica. Este comportamiento no es típico para la quitina debido a su alto grado de acetilación.

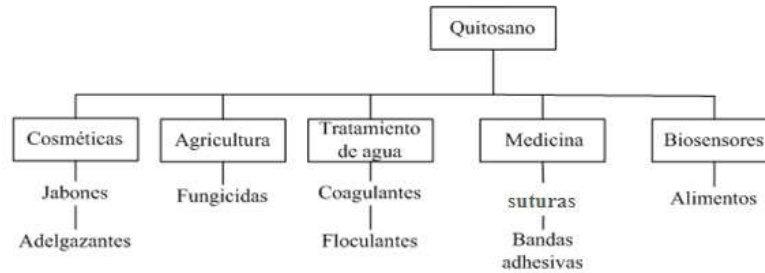
El quitosano es insoluble en H_2SO_4 y de solubilidad limitada en H_3PO_4 . Además es soluble en mezclas de alcohol y agua.

4.4. BIODEGRADABILIDAD.

Como un polímero de interés en sistemas alimenticios, la biodegradación de la quitina y el quitosano es una propiedad importante para ser considerada porque muchas de las aplicaciones en alimentos se relacionan directa o indirectamente con la capacidad de las enzimas para despolimerizarse. Solamente la biodegradabilidad no es una característica relevante de estos biopolímeros, también la no toxicidad de la degradación de los productos, es lo más significativo para las aplicaciones biomédicas y alimenticias.

El quitosano es bioabsorbible y biodegradable, y se ha demostrado que es lentamente degradado principalmente por las enzimas quitosinasas y lisozimas; con las primeras, la biodegradación sucede hasta en un 75%, y hasta en un 35% con lisozimas.

5.- APLICACIONES DEL QUITOSANO



Por sus naturalezas catiónica en soluciones ácidas, que le confiere propiedades únicas relativas a otros polisacáridos, la industria del quitosano y algunos de sus derivados se han estimulado internacionalmente, encontrándose un amplio universo de aplicaciones.

5.1.- APLICACIONES BIOMÉDICAS.

Este biomaterial ha sido ensayado para múltiples aplicaciones biomédicas, facilitando el proceso de cicatrización en heridas, lesiones por quemaduras y la recuperación de lesiones cutáneas crónicas; sus efectos han sido asociados con la activación de macrófagos, estimulación de fibroblastos activación mitogénica y facilitación de adhesión intercelular. Es esta aplicación la que se va a desarrollar en este proyecto.

PARTE EXPERIMENTAL

6.- PROCESO DE OBTENCION DE HIDROGELES DE QUITOSANO

6.1.- INTRODUCCIÓN.

En este proyecto se pretende obtener hidrogeles de quitosano aptos para ser empleados como soporte de células en aspectos relacionados con la ingeniería de tejidos del cartílago. Estos hidrogeles biocompatibles, deberán de ser estables a corto plazo pero biodegradables a largo plazo en un medio fisiológico. Por este motivo empleamos quitosano como matriz polimérica de los hidrogeles. Además, deben ser fácilmente manipulables y presentar ciertas características físicas en el medio fisiológico que permitan o favorezcan la aplicación de estos en la ingeniería de tejidos. Obviamente, existen varias matrices poliméricas muy comunes, que presentan todas estas características, como por ejemplo, colágeno o agarosa. Sin embargo, a diferencia del quitosano, sus hidrogeles son un buen sustrato alimenticio y son consumidos rápidamente durante el desarrollo de las células cultivadas.

Durante el desarrollo de este proyecto fin de carrera (PFC) estudiaremos distintas concentraciones de quitosano y diferentes procesos de gelificación, en un esfuerzo por optimizar las condiciones para la preparación de dichos hidrogeles. Por consiguiente, estudiamos distintas concentraciones de quitosano y diferentes procesos de gelificación, en un esfuerzo por encontrar las condiciones más idóneas para la preparación de dichos hidrogeles.

El proceso utilizado en el PFC para la obtención de este tipo de hidrogeles, consiste en neutralizar disoluciones acuosas ácidas de quitosano de diferentes concentraciones. Esta neutralización produce la gelificación de estas disoluciones acuosas, pues el quitosano no es soluble en agua a pHs neutros o básicos.

Por consiguiente, en este PFC se estudian principalmente:

1º.- el efecto de diferentes concentraciones de quitosano y 2º.- el efecto de distintos agentes neutralizantes en la preparación de hidrogeles con unas características que permitan aplicaciones futuras en aspectos relacionados con la ingeniería de tejidos del cartílago.

Para optimizar el rango de concentraciones de quitosano que conduce a la obtención de los hidrogeles más adecuados se procedió de la siguiente manera: En primer lugar se emplearon concentraciones de quitosano muy diferentes (1, 2, 3, 4 y 5%) para establecer un rango de concentraciones más estrecho (1 – 2%) que después se estudio más detenidamente, empleando concentraciones más similares (1, 1.25, 1.50, 1.75 y 2%) hasta encontrar un estrecho rango óptimo para la obtención de hidrogeles con las características deseadas.

Cada una de las disoluciones de diferente concentración de quitosano fue neutralizada con tres agentes neutralizantes distintos, para determinar no solo un estrecho rango de concentraciones óptimo sino también el agente neutralizante más adecuado.

Según el agente neutralizante empleado, la formación del hidrogel se produce bien a temperatura ambiente o a temperaturas más elevadas.

Para la obtención de **hidrogeles a temperatura ambiente** empleamos como agentes neutralizantes:

1.- disoluciones de NaOH 0.1 – 1 M que producen la rápida gelificación de las disoluciones de quitosano a pHs > 7.

2.- amoníaco gaseoso en muy bajas concentraciones que produce una gelificación mucho más lenta pero también más homogénea que en el caso anterior 1. Los subproductos de estas dos neutralizaciones 1 y 2, exceso de NaOH y NH₄OH y pequeñas cantidades de NaCl y NH₄Cl, respectivamente, se eliminan eficazmente en el proceso de lavado de los hidrogeles.

Cuando se utiliza glicerofosfato disódico como agente neutralizante, la formación del hidrogel no se produce a temperatura ambiente al alcanzar pH neutro o fisiológico, sino que es necesario calentar la disolución acuosa neutralizada para que se produzca su gelificación. Un ejemplo ideal, sería conseguir disoluciones neutralizadas que gelificasen simplemente al calentarlas hasta la temperatura corporal humana de 37°C. Afortunadamente, los subproductos de la neutralización, principalmente cantidades apreciables de ácido glicerofosfórico, no alteran significativamente el medio fisiológico y por tanto no afectan al cultivo de células, ya que los hidrogeles obtenidos con glicerofosfato no se someten a ningún proceso de lavado o purificación.

6.2.- PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE QUITOSANO.

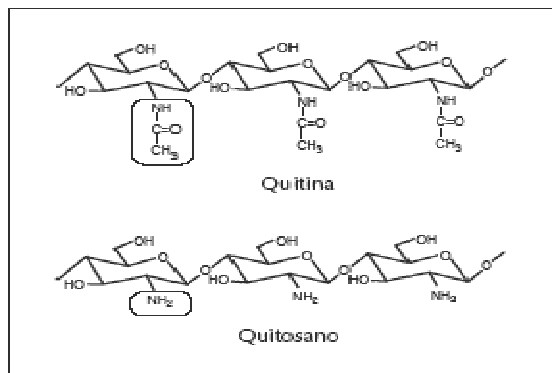
El quitosano es el derivado principal de la quitina, que puede ser obtenido mediante un proceso químico sencillo de desacetilación. Bajo este término se agrupa una familia de co-polímeros que se diferencian principalmente en el grado de desacetilación y en el peso molecular.

En este PFC emplearemos siempre quitosanos de pesos moleculares medios y con grados de desacetilación > 75%.

La quitina está compuesto por amino azúcares unidos entre sí por enlaces glicosídicos $\beta(1\rightarrow4)$ formando una cadena lineal de unidades de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa algunas de las cuales se encuentran desacetiladas

El quitosano es un polisacárido lineal que se obtiene por desacetilación extensiva de la quitina y está compuesto por dos tipos de unidades estructurales distribuidas de manera aleatoria a lo largo de la cadena, la N-acetil-D-glucosamina y la D-glucosamina, las cuales se encuentran unidas entre sí por enlaces del tipo $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicos.

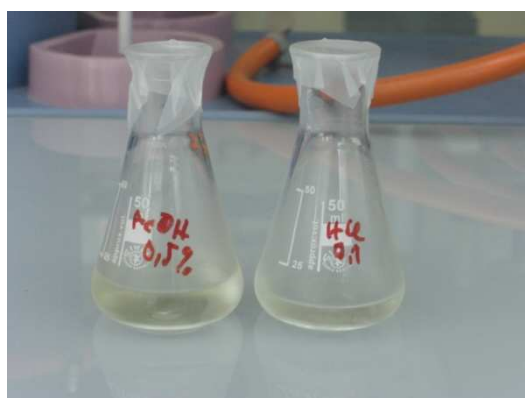
La desacetilación de la quitina para producir quitosano se produce mediante la hidrólisis del enlace amida de sus grupos acetamido.



El quitosano no es soluble en agua a pHs neutros o básicos, pero sí que se disuelve a pHs ácidos, debido a que sus grupos amino ($-\text{NH}_2$) forman las sales de amonio correspondientes ($-\text{NH}_3^+$). A concentraciones moderadas ($< 6\%$), resulta fácilmente soluble en ácidos acuosos diluidos, tales como acético o ácido clorhídrico diluidos.

Normalmente, en este PFC, disolvemos el quitosano (1 - 5%) en ácido acético acuoso al 0.5% o en ácido clorhídrico 0.1M. Es importante evitar concentraciones mayores de ácido pues durante la realización de este PFC pudimos comprobar experimentalmente que producen una degradación significativa de las cadenas de quitosano (disminución de su peso molecular).

A pesar de utilizar en este PFC quitosanos de pesos moleculares medios, las disoluciones obtenidas presentan viscosidades elevadas, siendo particularmente altas a partir de concentraciones $> 2\%$. Para concentraciones de quitosano de hasta el 3% a temperaturas moderadas $40^\circ\text{C} - 60^\circ\text{C}$, la agitación magnética resulta eficaz permitiendo obtener disoluciones que se conservan totalmente homogéneas durante varias horas a 5°C (tiempos o temperaturas de conservación más elevadas producen disminuciones significativas del peso molecular del quitosano). Para las mayores concentraciones (4-5%) la agitación magnética puede resultar imposible, incluso a temperaturas elevadas ($60-80^\circ\text{C}$), por lo que en estos casos empleamos agitación mecánica. Debido a las viscosidades tan elevadas, la preparación de las disoluciones más concentradas (5%) puede resultar tediosa y no suelen resultar completamente homogéneas.



La siguiente fotografía muestra disoluciones recién preparadas de quitosano (de peso molecular medio) al 1% en ácido acético del 0.5% y en ácido clorhídrico 0.1M, obtenidas con agitación magnética a 40°C -60°C y después enfriadas a temperatura ambiente 25°C.

Para acelerar el proceso de disolución del quitosano en ácido acético 0.5% o en ácido clorhídrico 0.1 M, empleamos temperaturas moderadas 40°C - 60°C para obtener disoluciones totalmente homogéneas en tiempos cortos de 5 – 15 minutos. En estas condiciones, las cadenas de quitosano no se degradan apreciablemente, incluso si estas disoluciones se guardan varias horas en frigorífico a 5°C (< 24h). Condiciones más drásticas de disolución (tiempos o temperaturas mayores o concentraciones de ácido más elevadas) o el almacenamiento prolongado de las disoluciones, conducen a la degradación de las cadenas quitosano. La disminución de su peso molecular en estas condiciones resulta muy evidente, debido a que la disminución de la viscosidad de las disoluciones se aprecia fácilmente a simple vista.



Como puede observarse en la siguiente fotografía de cuatro disoluciones de quitosano del 1% al 1.75% en ácido clorhídrico 0.1 M a 25°C, las disoluciones preparadas en estas condiciones moderadas, resultan incoloras y totalmente transparentes y homogéneas, hasta concentraciones de quitosano del 2%.

A concentraciones > 2%, su opacidad y viscosidad aumentan con la concentración, llegando a presentar un aspecto similar a un gel opaco-lechoso, tal y como puede observarse en la siguiente fotografía de una disolución de quitosano al 4% en ácido clorhídrico 0.1M a 25°C.



En esta misma fotografía puede observarse claramente, que la disolución presenta coloración marrón claro. Esto es debido a que el quitosano comercial lo empleamos tal y como se recibe sin ser sometido a ningún proceso de purificación. La purificación de quitosano puede resultar muy tediosa si el laboratorio no dispone de técnicas especiales como liofilización.

Las disoluciones de quitosano de concentraciones muy distintas presentan diferencias muy notables a simple vista. En particular, las concentraciones extremas presentan un aspecto poco idóneo para la obtención de hidrogeles con las características requeridas, bien por su baja viscosidad y excesiva dilución (concentraciones $< 1\%$) o su elevada viscosidad y falta de homogeneidad (concentraciones $> 2-3\%$). De hecho, las de $< 1\%$ no gelifican o producen geles muy débiles que pierden fácilmente su cohesión resultando imposibles de manipular. Mientras que las de $> 2-3\%$ generan hidrogeles que mecánicamente se parecen a elastómeros resistentes, similares a gomas de caucho (como el caucho de una tetina de cuentagotas)

Por el contrario, en las disoluciones de quitosano de concentraciones parecidas (entre el 1 y el 2%) aunque pueden apreciarse diferencias de viscosidad, resultan muy similares y prácticamente todas generan hidrogeles casi idóneos, con cualquiera de los tres agentes neutralizantes empleados en este PFC.

6.3.-NEUTRALIZACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE QUITOSANO.

La neutralización de las disoluciones ácidas de quitosano se realiza con tres bases o agentes neutralizantes acuosos, dos bases fuertes: NaOH y NH_4OH (realmente se emplea amoníaco gas que al disolverse en la disolución acuosa genera NH_4OH) y una sal básica, glicerofosfato disódico. Las dos primeras bases se emplean en exceso, por lo que el hidrogel obtenido es fuertemente básico y debe de someterse a un proceso de lavado hasta que alcanza pH 7. En el caso del glicerofosfato, la sal básica se añade hasta conseguir que la disolución de quitosano presente pH 7. En este caso, la gelificación se

produce al elevar la temperatura de la disolución neutralizada y el hidrogel obtenido se emplea como tal, sin proceso de lavado.

Con NaOH y NH_3 , la neutralización se realiza a temperatura ambiente y en reposo absoluto. Sin agitación, la velocidad de neutralización viene determinada principalmente, por la velocidad de difusión de la base en la disolución de quitosano. A medida que las capas exteriores de la disolución de quitosano se neutralizan se produce su gelificación. La difusión de los iones básicos a través del hidrogel resulta más lenta que en la disolución acuosa. Por consiguiente, la neutralización y gelificación de las capas internas de la disolución de quitosano podría producirse más lentamente que la gelificación de las capas externas. Sin embargo, hemos podido constatar experimentalmente que ocurre justamente lo contrario, tal y como se explica más adelante.

La lentitud del proceso resulta particularmente patente, cuando se emplea NH_3 . Esto es debido, a que antes del lento proceso de difusión en la disolución y gel de quitosano, las moléculas de NH_3 deben de difundir desde la fase gaseosa a la disolución acuosa a través de la interfase. El proceso resulta muy lento, ya que se emplean como fuente de NH_3 pequeñas cantidades (50 - 100 mL) de disoluciones de NH_4OH muy diluidas 0.1 – 1 M.

En el caso del glicerofosfato, la neutralización se lleva a cabo con agitación vigorosa, resultando relativamente rápida a bajas temperaturas (10°C), ya que temperaturas más elevadas favorecen la gelificación.

6.3.1.- Neutralización con NaOH acuoso.

La neutralización con NaOH es evidente e inmediata, pero únicamente permite obtener hidrogeles homogéneos de pequeño tamaño. Por ejemplo, es muy conveniente para gelificar pequeñas gotas o hilos de disolución de quitosano.

Normalmente, se realiza a temperatura ambiente utilizando disoluciones de NaOH 0.1 - 1M. La neutralización se realiza poniendo cuidadosamente en contacto la disolución de quitosano con la de NaOH. Como la densidad de ambas disoluciones es similar, estas tienden a mezclarse desordenadamente, produciendo hidrogeles poco uniformes y de geometrías no deseadas. Únicamente, cuando se emplean pequeños volúmenes de disolución de quitosano como gotas, lentejas o hilos, la gelificación se produce uniformemente, conservándose la geometría. Como el espesor de estos objetos es pequeño, la gelificación es uniforme e inmediata y la eliminación del exceso de NaOH de estos pequeños geles se produce también rápidamente.

En nuestro caso, introducimos la disolución de quitosano en los pequeños pocillos de unos 2-3 cm de diámetro de una placa petri de poliestireno (PS) y sumergimos esta placa lenta y cuidadosamente en la disolución de NaOH (100mL). En algunas ocasiones la disolución de quitosano queda adherida al PS permaneciendo sumergida sin perder la forma. En estas raras ocasiones la gelificación se produce uniformemente para obtener geles cilíndricos de 2-3 cm de diámetro y unos 0.5 cm de espesor. Pero generalmente, en la mayor parte de los casos la disolución de quitosano tiende mezclarse con la de

NaOH produciendo geles poco homogéneos y uniformes, difíciles de manipular sin que se rompan en fragmentos poco útiles para su caracterización.



La siguiente figura muestra la gelificación de una disolución de quitosano al 1% en HCl 0.1M contenida en los pocillos de una placa petri de PS sumergida en una disolución de NaOH 1M a 25°C. Puede observarse que la mayor parte de los geles son muy poco cilíndricos y uniformes. Únicamente, el de la esquina inferior derecha resultó suficientemente homogéneo, uniforme y manipulable como para permitir su estudio y caracterización.

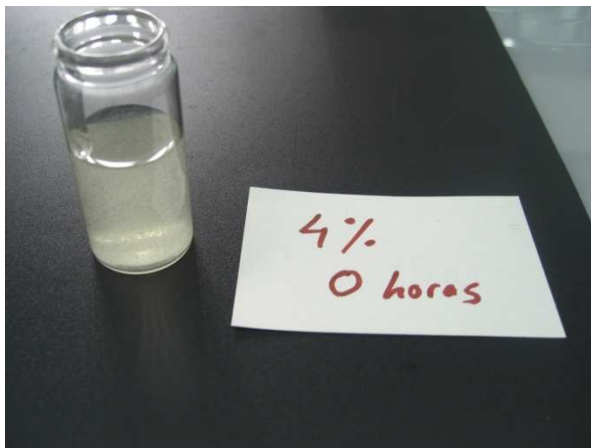
6.3.2.- Neutralización con NH_3 gaseoso.

Aunque muy lenta, la neutralización con gas amoníaco resulta muy conveniente y práctica, pues es sencilla y permite obtener fácilmente hidrogeles homogéneos y resistentes con cualquier forma geométrica.

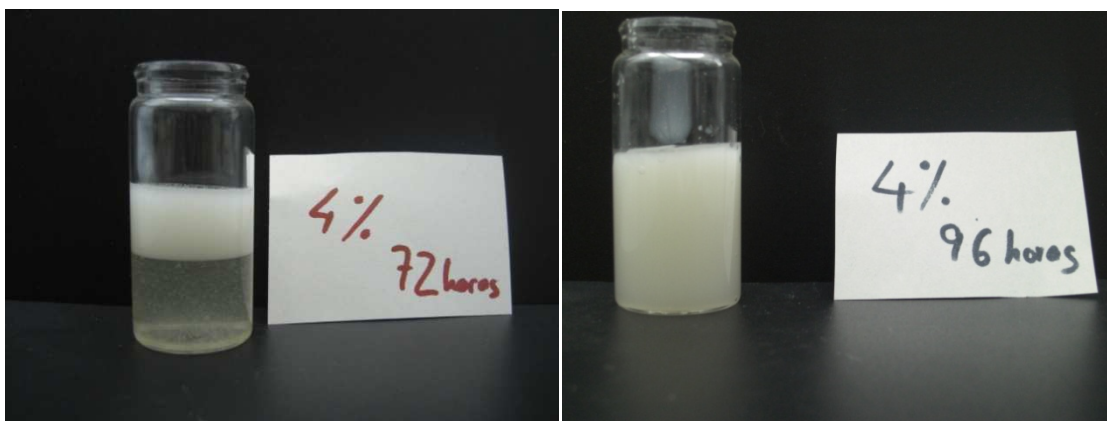
Se realiza colocando en un desecador cerrado a 25°C dos vasos separados conteniendo; el uno la disolución de quitosano y el otro 50 - 100 mL de NH_4OH 0.1 - 1 M. Cuanto menor es la concentración de NH_4OH más lenta es la neutralización, pero más homogéneo resulta el hidrogel obtenido. Sin embargo, la gelificación/ neutralización con NH_4OH 0.1M resulta tan lenta que no parece muy práctica. Generalmente, la más empleada en este PFC, es la que emplea NH_4OH 1M.

El proceso de neutralización parece controlado por la velocidad de disolución del amoníaco en la disolución de quitosano más que por la velocidad de su difusión a través del gel. En cualquier caso, la velocidad de neutralización es muy pequeña y la gelificación total de la disolución de quitosano puede tardar varios días.

El exceso de amoníaco se elimina lavando el gel libre con abundante agua destilada. La velocidad de lavado es también muy pequeña y por consiguiente, la completa neutralización del hidrogel de quitosano puede tardar desde 12h a 3 o 4 días.



La siguiente fotografía muestra una disolución de quitosano al 4% en HCl 0.1M a 25°C, antes de ser neutralizada-gelificada. Puede observarse que no es completamente transparente ni homogénea.



Las siguientes fotografías muestran la misma disolución de la fotografía anterior después de permanecer durante 72 y 96h a 25°C, en un recipiente cerrado conteniendo un vaso con 100 mL NH_4OH 0.1M. Puede observarse que después de 72 h aproximadamente el 40% de la disolución ha gelificado, mientras que después de 96h la gelificación es completa. Este resultado sugiere que la velocidad de disolución del NH_3 en la disolución de quitosano es más lenta que su difusión a través del hidrogel. Finalmente, el gel obtenido pudo desmoldearse, para obtener un cilindro gomoso con una apariencia y propiedades mecánicas similares a un tapón de caucho de una botella.

6.3.3.- Neutralización con glicerofosfato disódico.

Los tres agentes neutralizantes empleados en este PFC se añaden a las disoluciones de quitosano con gran exceso estequiométrico. Sin embargo, el glicerofosfato disódico es el único agente que se añade en exceso hasta alcanzar pH neutro, mientras que los otros dos (NaOH y NH_3) se añaden en exceso alcanzando pH elevados = 14. Esto es debido a que el glicerofosfato disódico es una sal de ácido débil (ácido glicerofosfórico) y base fuerte (NaOH) y por consiguiente, al disolverse en la disolución ácida de quitosano forma una disolución tampón que regula el pH.

Esto quiere decir, que es necesario añadir grandes cantidades de glicerofosfato disódico para obtener pequeños incrementos de pH. En consecuencia, se suele añadir en pequeñas porciones en estado sólido o en disoluciones muy concentradas, para no incrementar excesivamente el volumen final de la disolución neutralizada. Esto permite emplear disoluciones diluidas de quitosano que son poco viscosas y muy homogéneas.

También, el glicerofosfato disódico es el único agente neutralizante que genera disoluciones neutralizadas que gelifican al elevar su temperatura y en particular a $T > 25^{\circ}\text{C}$. Además, como la gelificación es reversible, los geles se licuan al ser enfriados y en particular en el frigorífico a $5 - 10^{\circ}\text{C}$.

Por consiguiente, la neutralización de las disoluciones de quitosano con glicerofosfato disódico se realiza a bajas temperaturas (10°C), para evitar los grandes aumentos de viscosidad que se producen cuando la disolución neutralizada comienza a gelificar.

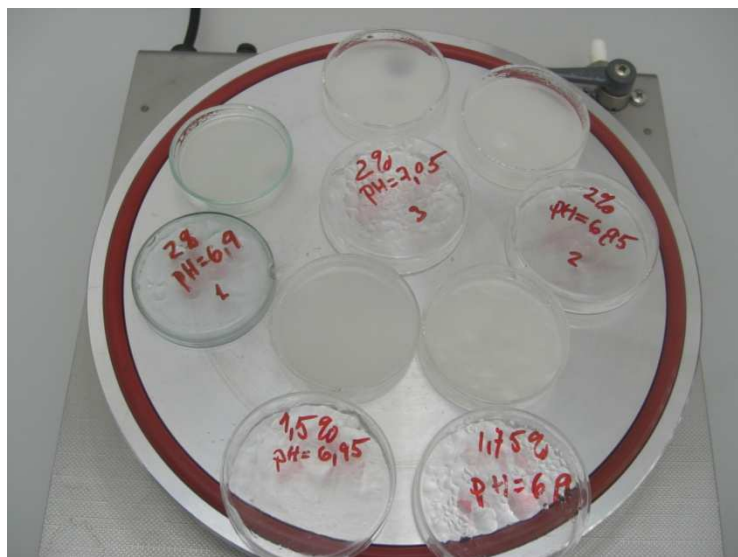
Normalmente, un vaso de precipitados conteniendo la disolución de quitosano, un agitador, un termómetro y la sonda de un pHmetro, se introduce en un baño de hielo y se le van añadiendo pequeñas porciones de glicerofosfato disódico manteniendo la $T = 10^{\circ}\text{C}$ y con agitación magnética. La neutralización llega a ser tediosa pues la adición de glicerofosfato disódico genera calor pero tan apenas modifica el pH de la disolución. Desafortunadamente, justo cuando el pH de la disolución se aproxima a 7, la disolución tampón formada es menos efectiva regulando el pH y entonces, puede resultar difícil ajustar el $\text{pH} = 7$.

La tabla siguiente muestra las cantidades de glicerofosfato disódico necesarias para ajustar el pH de algunas de las disoluciones de quitosano a 10°C .

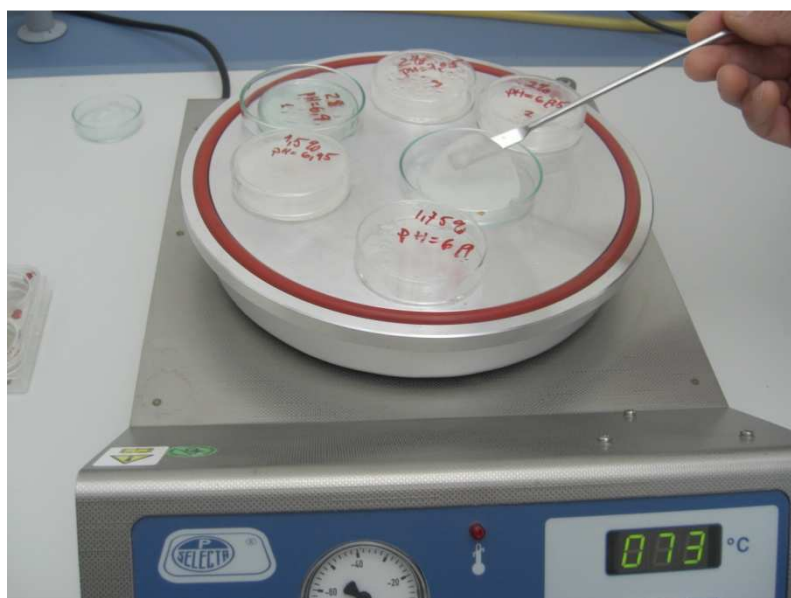
% De Quitosano	Disolucion 0,1 N (ml)	Masa quitosano (mg)	pH inicial	Masa	Disolucion	Concentracion	pH final
				Glicerofosfato (g)	Glicerofosfato (ml)	Glicerofosfato (g/ml)	
1%	50 ml	500 mg	1,9	6,5 g	7 ml	0,928	6,78
2%	50 ml	1000 mg	2,07	4,25 g	5 ml	0,85	6,9
2%	50 ml	1000 mg	2,13	7,0 g	9 ml	0,777	7,05
2%	50 ml	1000 mg	2,05	5,5 g	6 ml	0,916	6,95
1,50%	50 ml	750 mg	1,56	7,0 g	10 ml	0,7	6,95
1,75%	50 ml	872,5 mg	1,83	5,0 g	6,25 ml	0,8	6,92

Una vez ajustado el pH entre 6.90 y 7.05 a 10°C , la disolución se vierte en pequeños moldes (normalmente placas petri de vidrio) que se tapan y se colocan en una estufa para calentarlas a temperatura constante. La temperatura se aumenta en incrementos de 10°C y se mantiene constante durante 10 minutos. En nuestro caso, las disoluciones comienzan a perder su transparencia (indicando que están gelificando) entre $50 - 60^{\circ}\text{C}$ pero los hidrogeles únicamente se pueden manipular sin romperse a $T > 60^{\circ}\text{C}$.

Puesto que la gelificación es reversible, la consistencia mecánica de las disoluciones gelificadas se pierde al disminuir su temperatura, aunque su transparencia original solo se recupera a la temperatura del frigorífico a $5 - 10^{\circ}\text{C}$.



La siguiente fotografía muestra placas petri destapadas a 60°C, que contienen disoluciones de distintas concentraciones de quitosano (1.5 – 2%) en HCl 0.1N, neutralizadas con glicerofosfato disódico hasta diferentes pHs (6.90 - 7.05). La tapa correspondiente de cada placa aparece rotulada (con el % de quitosano y el pH) y colocada justo inmediatamente debajo (según el eje Y). En la parte superior de la fotografía aparecen tres hidrogel de quitosano al 2% a diferentes pHs (de izquierda a derecha 6.9, 7.05 y 6.95) y abajo (de izquierda a derecha) dos de 1.5 y 1.75% a pH de 6.95 y 6.90, respectivamente. Aunque no todas estas placas gelificaron de igual manera (a la misma temperatura) las diferencias tampoco resultaron muy significativas. Por el contrario, la consistencia de los geles aumenta considerablemente con la concentración de quitosano aunque las pequeñas diferencias de pH no presentaron un efecto muy significativo en dicha consistencia.

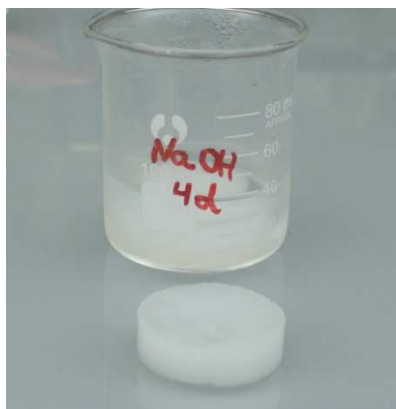


La siguiente fotografía muestra como a 73°C pueden manipularse los geles del experimento de la fotografía anterior. En particular, para los de mayor concentración de quitosano (1.75 y 2%), puede observarse que su diámetro se ha reducido ligeramente y que no presentan ninguna tendencia a romperse al ser transportados con una espátula.

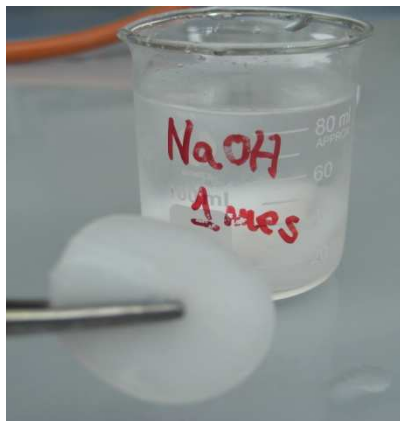
Paradójicamente, las elevadas temperaturas necesarias para que nuestros hidrogeles de quitosano/glicerofosfato mantengan cierta consistencia (ciertas características mecánicas) necesaria para la ingeniería de tejidos del cartílago, hacen imposible dicho cultivo. De acuerdo con la bibliografía [1], esto es debido en gran parte a emplear un quitosano comercial no purificado con un grado de desacetilación pequeño, heterogéneo y poco preciso $> 75\%$. De hecho, esta bibliografía sugiere el empleo de quitosanos con grados de desacetilación $> 95\%$, para que los geles correspondientes sean aptos para el cultivo celular a 37°C . Sin embargo, el peso molecular del quitosano o su distribución, no presentan una influencia muy notable, siendo el grado de desacetilación el factor determinante. Desafortunadamente, las técnicas para la desacetilación y purificación del quitosano comercial no están al alcance de nuestro laboratorio.

6.4. – ENDURECIMIENTO.

Independientemente del agente neutralizante empleado, nuestros hidrogeles con concentraciones de quitosano $< 1.25\%$ muestran poca consistencia mecánica. Incluso los de elevadas concentraciones de quitosano ($> 2\%$), que aparentemente son muy robustos mecánicamente, presentan resistencia inferior a la necesaria para el cultivo celular de cartílago. Para aumentar dicha resistencia se sometieron a un proceso de endurecimiento térmico y/o mediante un agente endurecedor NaOH. El tratamiento consiste en sumergirlos en agua destilada y/o en disolución de NaOH concentrado 20 – 40 %, durante diferentes tiempos (de 10 min a varios días) y a distintas temperaturas ($5 - 100^{\circ}\text{C}$). El resultado más significativo de dichos experimentos fue que incluso a bajas temperaturas $5-10^{\circ}\text{C}$ en NaOH 20%, los geles se endurecen tan notablemente que llegan a convertirse en elastómeros similares al caucho común.



La siguiente fotografía muestra un gel del 1% de quitosano en HCl 0.1N neutralizado con NH_3 , después de permanecer sumergido en NaOH 20% durante cuatro días a 25°C . Puede observarse que muestra una perfecta forma cilíndrica con sus contornos bien definidos y sin rotura alguna, a pesar de haber sido transportado descuidadamente.



La siguiente fotografía muestra el mismo gel de la foto anterior después de permanecer en las mismas condiciones durante un mes en el frigorífico a 5°C. Puede observarse que su endurecimiento es tan notable que puede presionarse con unas pinzas sin ninguna tendencia a romperse.

6.5.- LAVADO.

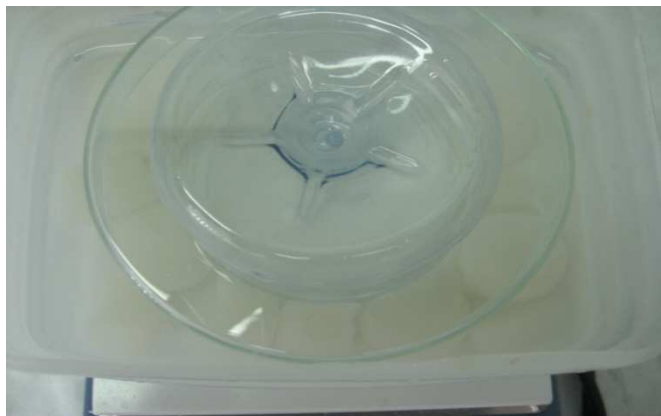
Únicamente son sometidos a proceso de lavado los geles obtenidos mediante neutralización de las disoluciones de quitosano con bases fuertes NaOH y NH_4OH .

Debido al empleo de un exceso de estas bases, los geles presentan pHs muy elevados (pH 14). El exceso de estas bases se retira lavando los geles con agua destilada hasta que alcanzan un $\text{pH} = 7$ en todo su volumen. Esto se comprueba aplastando entre pedacitos de papel indicador de pH, pequeñas secciones de cualquier parte de la geometría del hidrogel. Cuando independientemente de su origen, todas las secciones muestran pH 7, los geles se conservan sumergidos en agua destilada a este pH y en el frigorífico a 5°C.

Aunque en estas condiciones, una degradación un poco significativa solo se observa después de unos días, normalmente los geles se caracterizan dentro de las 24h después de su lavado final. Además, la caracterización de los hidrogeles la realizamos únicamente, cuando alcanzan pH 7. Por consiguiente, desconocemos por completo el efecto que causa el proceso de lavado en las propiedades mecánicas de estos geles.

Una característica del proceso de lavado es la lentitud con la que los geles alcanzan pH neutro. Normalmente lo realizamos sumergiendo los geles enteros (una vez desmoldados) en agua destilada (500 mL) con agitación magnética a 25°C. Para que el agitador no dañe los geles, se aísla en el centro del recipiente mediante una rejilla de plástico que permite el libre flujo del agua destilada. El agua se cambia periódicamente hasta que permanece neutra (según un proceso discontinuo). A partir de este momento, se extraen pequeños fragmentos del gel y se comprueba su pH presionándolos entre pedacitos de papel indicador de pH. Como de alguna manera, la estructura del gel es similar al de una esponja, se comportan como tales en el sentido de que sueltan el líquido que retienen al ser presionados y de esta manera podemos medir su pH (este fenómeno no es reversible, ya que los entrecruzamientos entre las cadenas de quitosano no son enlaces covalentes, como ocurriría en una esponja similar).

La agitación resulta el procedimiento más práctico y efectivo para acelerar el proceso de lavado. Pues por supuesto, que el empleo de agua de lavado con $\text{pH} < 7$ no acelera el proceso de lavado, sino que únicamente conduce a la desintegración del gel al disolverse el quitosano en el medio ácido.



La siguiente fotografía muestra varios hidrogel de quitosano (al 1.75% en AcOH del 0.5% y neutralizados con NH_3) durante el proceso de lavado. En el centro de la placa agitadora, el agitador queda separado de los geles cilíndricos mediante el fondo de una botella de PET perforada en forma de rejilla. Mediante la agitación se consigue que no solo el agua este en continuo movimiento, sino que incluso los geles giren alrededor del fondo de la botella sin resultar dañados.



En la fotografía siguiente se muestran los geles del experimento de lavado de la foto anterior, una vez han alcanzado $\text{pH} 7$. Puede observarse, que la mayor parte presentan formas y tamaños parecidos y por tanto, suelen alcanzar la neutralidad todos al mismo tiempo. Tal y como muestra la foto, los geles neutros se guardan a 5°C , sumergidos en agua destilada durante un tiempo máximo de 24h, hasta su caracterización.

6.6.- ESTERILIZACIÓN.

Para el cultivo celular en y/o sobre los geles preparados, necesitamos que sean estériles. Esto puede conseguirse; 1.- esterilizando los geles una vez preparados o 2.- preparándolos en condiciones estériles.

1.- Las formas más comunes de esterilización de los geles, con calor o con radiación UV, no resultan convenientes. La esterilización con calor causa una modificación radical de la estructura de los geles y la esterilización UV no resulta muy segura, debido a la poca transparencia de los geles y a su elevado grosor que en ocasiones es superior a 1 o 2 cm.

2.- Por el contrario, preparar los geles en condiciones estériles resulta muy práctico. Esto es debido, a que durante la mayor parte de su proceso de obtención en el laboratorio convencional, los geles y sus productos de partida se encuentran de manera natural en condiciones estériles, pues presentan pH extremos = 1 o = 14.

Por consiguiente, es suficiente con realizar en condiciones estériles, únicamente la última etapa del proceso de obtención de los geles. Obviamente, esta última etapa es aquella en la que el gel alcanza pH 7.

Cuando se emplea NaOH o NH₃ como agentes neutralizantes, la última etapa del proceso es el lavado de los geles. Por consiguiente, para preparar geles esterilizados basta con realizar la etapa de lavado tal y como se describió anteriormente pero trabajando en condiciones estériles (en campana biológica).

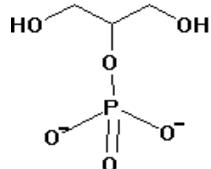
Por otro lado, cuando se emplea glicerofosfato disódico como agente neutralizante, es necesario realizar la neutralización y también la gelificación en campana biológica.

Los geles esterilizados se guardan sumergidos en tampón salino pH 7, en el frigorífico a 5°C y en condiciones estériles, durante un tiempo no superior a 24h antes de su caracterización.

6.7.- MATERIALES

- Quitina comercial $PM_{\text{monomero}}=154$ u.a. Origen: cascara de cangrejo. $\eta_{\text{brookfield}}=200\ 000$ cps. $\eta=200\ 000$ a $800\ 000$ cp. Grado desacetilación 75%-85%. Empresa Aldrich.

- Glicerofosfato ($C_3H_7Na_2O_6P \times 5 H_2O$) $PM = 306,12$ u.a. Empresa Fluka



Beta Glicerofosfato

7.- PROCESO DE CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROGELES DE QUITOSANO OBTENIDOS.

7.1.- INTRODUCCIÓN.

Los geles neutros con mejores características físicas aparentes, fueron sometidos a caracterización exclusivamente mecánica. Esta caracterización consiste esencialmente, en medir la carga y el desplazamiento del gel en ensayos de compresión realizados con una máquina de ensayos INSTRON.

Únicamente, se caracterizaron algunos de los geles obtenidos con NH_3 o glicerofosfato disódico como agentes neutralizantes. El otro agente gelificante NaOH interviene en el proceso de tratamiento de algunos de los geles seleccionados, pero únicamente como un agente endurecedor.

Como el agente neutralizante/gelificante más adecuado resultó ser el NH_3 , la mayor parte de los geles caracterizados son los obtenidos utilizando este agente. Por el contrario, solo se caracterizaron tres hidrogeles derivados de glicerofosfato disódico debido a las elevadas temperaturas de gelificación necesarias cuando se emplea este agente neutralizante.

Los geles estudiados mecánicamente pueden agruparse de la siguiente manera:

- 1º.- Geles con concentraciones de quitosano muy diferentes (1%, 2%, 3%, 4% y 5%), agente gelificante NH_3 1 M.
- 2º.- Geles con concentraciones de quitosano parecidas (1.25%, 1.5%, 1.6% y 1.75%), agente gelificante NH_3 1 M.
- 3º.- Geles con concentraciones de quitosano parecidas (1.5%, 1.75% y 2%), agente neutralizante glicerofosfato disódico.
- 4º.- Gel 2% quitosano y agente gelificante NH_3 0.1 M.
- 5º.- Gel 2% quitosano y agente gelificante NH_3 1 M. Guardado en el frigorífico durante 96h a 5°C
- 6º.- Geles con concentraciones de quitosano muy diferentes (2%, 3% y 5%), agente gelificante NH_3 1 M. Endurecidos, mediante calentamiento a 100°C durante 10 minutos sumergidos en agua destilada.
- 7º.- Gel 2% quitosano y agente gelificante NH_3 1 M. Endurecido, mediante 1.- calentamiento a 100°C durante 10 minutos sumergido en agua destilada y después, 2º.- sumergido en NaOH 20% durante 24h.

El estudio de las propiedades mecánicas de los cuatro primeros grupos permitió determinar la concentración de quitosano (del 1 al 5%) y el agente neutralizante/gelificante más adecuado (NH_3 0.1 M o NH_3 1M o glicerofosfato disódico). Estos fueron 2% quitosano y NH_3 1 M, respectivamente.

Ninguno de los geles estudiados presento suficiente resistencia mecánica para el cultivo celular de cartílago, el resto de los estudios mecánicos se realizó sobre el gel 2% quitosano y NH_3 1 M sometido a diferentes procesos de reblandecimiento (degradación) o endurecimiento (con calor y/o NaOH 20%).

El estudio del 5º grupo da una idea de la degradación del gel 2% quitosano y NH_3 1 M, durante su almacenamiento en el frigorífico a 5°C.

Finalmente, el estudio mecánico de los dos últimos grupos 6º y 7º, trata de determinar si podrían prepararse geles con suficiente resistencia, sometiendo a los geles más robustos mecánicamente a procesos de endurecimiento drásticos (100°C y NaOH 20%).

7.2.- DESCRIPCIÓN DE LOS EXPERIMENTOS MECANICOS.

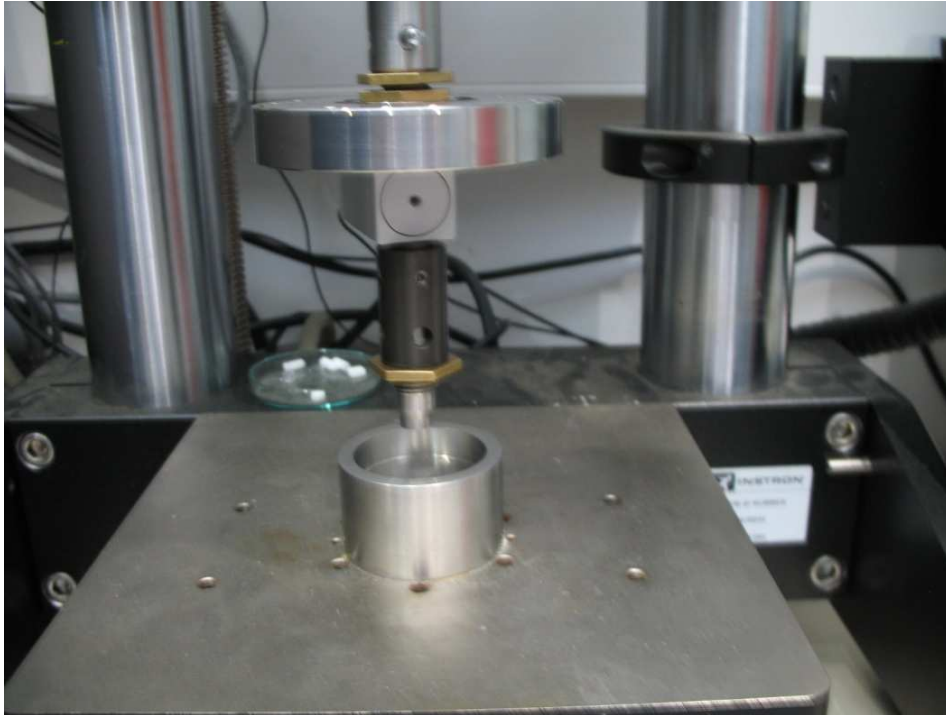
Cada uno de los geles seleccionado para su estudio mecánico, se corta en pequeñas muestras idénticas de tamaño y forma. Cada una de estas muestras se ensaya a compresión en una máquina de ensayos uniaxiales electromecánica INSTRON MicroTester 5548. Esta máquina de ensayos posee una precisión de 0.0001 N en fuerza y 0.001 mm en desplazamiento. El ensayo de compresión no confinada fue realizado con control en desplazamiento a 0.01mm/s hasta alcanzar un máximo de 4,9 N. La célula de carga empleada es de 5N. Las muestras estaban sumergidas en un tampón salino a 37°C para garantizar sus niveles de hidratación.

Estos experimentos de compresión nos permiten obtener datos de carga/desplazamiento que se pueden transformar a tensión/deformación. Con las curvas de tensión/deformación, podemos obtener las propiedades mecánicas (módulos de Young y tangentes) de los diferentes geles. Cada conjunto de geles se repitió como mínimo 6 veces. Los resultados se muestran como la media aritmética +/- la desviación estándar y el error típico de los distintos módulos relacionados con la rigidez de los geles.

Estudiamos 3 intervalos: inicial, al 10% de deformación y al 20% de deformación.

- El inicial, correspondiente al módulo de Young
- La pendiente al 10% de deformación, correspondiente al módulo tangente al 10%
- La pendiente al 20% de deformación, correspondiente al módulo tangente al 20%

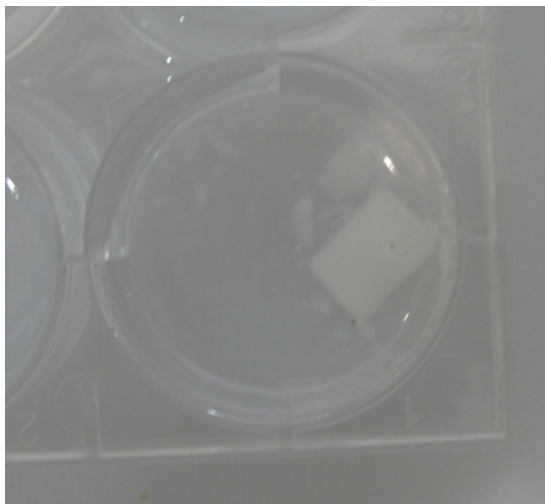
Estos son los intervalos más interesantes para las posibles aplicaciones futuras de los geles en aspectos relacionados con la ingeniería de tejidos del cartílago.



La fotografía siguiente muestra la máquina de ensayos INSTRON empleada en este PFC para la caracterización de nuestros hidrogeles, en el momento de la realización de uno de los ensayos de compresión.



La siguiente fotografía muestra el tamaño y forma de las muestras estudiadas, preparadas a partir de un gel cilíndrico (3cm diámetro y 0.5 cm espesor) de 2% quitosano y NH_3 1M.



La siguiente fotografía se observa una muestra de gel obtenida con un sacabocados en un pocillo de una placa de PS en agua destilada antes del ensayo mecánico.

7.3.- TRATAMIENTO DE DATOS MECANICOS

Cada ensayo mecánico, de cada una de las muestras de los geles en la maquina INSTRON, produce un archivo de datos en formato (.csv) que es compatible con EXCEL.

En este archivo, están todos los datos de cada muestra de gel, que son necesarios para los cálculos (diámetro, espesor) y los datos obtenidos durante el ensayo: tiempo (sg), extensión (mm), carga (N), carga de compresión (N), carga por compresión (mm/mm), deformación real (mm/mm) y esfuerzo de compresión (Mpa).

Además, también se obtiene un archivo (.pdf) que nos sirve como informe gráfico del ensayo, pues contiene todos los datos de las variables del experimento y una grafica con la curva de Carga (N) vs Extensión (mm).

Como un ejemplo, se muestra la siguiente tabla procedente del archivo de datos (.csv) correspondiente a un ensayo de una de las muestras del gel 1.75% quitosano / NH_3 1M. Este archivo viene codificado como (17908_170908_3). Más adelante se explica el significado detallado de cada código. La tabla muestra el peso y dimensiones de la muestra y el tiempo (sg), extensión (mm), carga (N), carga de compresión (N), carga por compresión (mm/mm), deformación real (mm/mm) y esfuerzo de compresión (Mpa) del ensayo.

Entradas de texto : GEL_QUIT_17908_170908_3						
Entradas de texto : Peso Seco						
Entradas de texto : Peso Húmedo						
Entradas numéricas : 0.00000						
Entradas numéricas : 0.00000						
Dimensión : 700.000 mm						
Dimensión : 10.000.000 mm						
Dimensión : 0.38485 cm^2						
Entradas de texto : Tipo ensayo						
Tiempo (sec)	Extensión (mm)	Carga (N)	Carga de control (N)	Deformación (mm/mm)	Deformación (mm/mm)	Esfuerzo de compresión (MPa)
0.00000	452.852	0.00036	-0.00036	0.00000	0.00000	-0.00001
0.00180	452.852	0.00036	-0.00036	0.00000	0.00000	-0.00001
0.01000	452.835	0.00028	-0.00028	0.00000	0.00000	-0.00001
0.20000	452.723	0.00028	-0.00028	0.00001	0.00001	-0.00001
0.30000	452.588	0.00025	-0.00025	0.00003	0.00003	-0.00001
0.40000	452.476	0.00023	-0.00023	0.00004	0.00004	-0.00001
0.50000	452.374	0.00021	-0.00021	0.00005	0.00005	-0.00001
0.60000	452.273	0.00017	-0.00017	0.00006	0.00006	0.00000
0.70000	452.172	0.00015	-0.00015	0.00007	0.00007	0.00000
0.80000	452.072	0.00010	-0.00010	0.00008	0.00008	0.00000
0.90000	451.973	0.00011	-0.00011	0.00009	0.00009	0.00000
100.000	451.871	0.00009	-0.00009	0.00010	0.00010	0.00000
110.000	451.772	0.00008	-0.00008	0.00011	0.00011	0.00000
120.000	451.672	0.00007	-0.00007	0.00012	0.00012	0.00000
130.000	451.571	0.00007	-0.00007	0.00013	0.00013	0.00000
140.000	451.472	0.00006	-0.00006	0.00014	0.00014	0.00000
150.000	451.371	0.00001	-0.00001	0.00015	0.00015	0.00000
160.000	451.270	0.00000	0.00000	0.00016	0.00016	0.00000
170.000	451.169	0.00000	0.00000	0.00017	0.00017	0.00000
180.000	451.070	-0.00003	0.00003	0.00018	0.00018	0.00000
190.000	450.970	-0.00002	0.00002	0.00019	0.00019	0.00000
200.000	450.871	-0.00006	0.00006	0.00020	0.00020	0.00000
210.000	450.770	-0.00007	0.00007	0.00021	0.00021	0.00000
220.000	450.670	-0.00008	0.00008	0.00022	0.00022	0.00000
230.000	450.572	-0.00014	0.00014	0.00023	0.00023	0.00000
240.000	450.474	-0.00015	0.00015	0.00024	0.00024	0.00000
250.000	450.373	-0.00015	0.00015	0.00025	0.00025	0.00000
260.000	450.274	-0.00014	0.00014	0.00026	0.00026	0.00000
270.000	450.172	-0.00020	0.00020	0.00027	0.00027	0.00001
280.000	450.070	-0.00019	0.00019	0.00028	0.00028	0.00001
290.000	449.971	-0.00020	0.00020	0.00029	0.00029	0.00001
300.000	449.871	-0.00020	0.00020	0.00030	0.00030	0.00001
310.000	449.769	-0.00019	0.00019	0.00031	0.00031	0.00001
320.000	449.668	-0.00020	0.00020	0.00032	0.00032	0.00001
330.000	449.569	-0.00018	0.00018	0.00033	0.00033	0.00000
340.000	449.469	-0.00016	0.00016	0.00034	0.00034	0.00000
350.000	449.369	-0.00013	0.00013	0.00035	0.00035	0.00000
360.000	449.270	-0.00009	0.00009	0.00036	0.00036	0.00000
370.000	449.170	-0.00008	0.00008	0.00037	0.00037	0.00000
380.000	449.070	-0.00008	0.00008	0.00038	0.00038	0.00000
390.000	448.971	-0.00009	0.00009	0.00039	0.00039	0.00000
400.000	448.873	-0.00013	0.00013	0.00040	0.00040	0.00000
410.000	448.774	-0.00011	0.00011	0.00041	0.00041	0.00000
420.000	448.675	-0.00015	0.00015	0.00042	0.00042	0.00000
430.000	448.574	-0.00017	0.00017	0.00043	0.00043	0.00000
440.000	448.471	-0.00016	0.00016	0.00045	0.00045	0.00000
450.000	448.372	-0.00019	0.00019	0.00046	0.00046	0.00000
460.000	448.272	-0.00020	0.00020	0.00047	0.00047	0.00001
470.000	448.171	-0.00023	0.00023	0.00048	0.00048	0.00001
480.000	448.070	-0.00023	0.00023	0.00049	0.00049	0.00001
490.000	447.969	-0.00025	0.00025	0.00050	0.00050	0.00001
500.000	447.870	-0.00027	0.00027	0.00051	0.00051	0.00001
510.000	447.768	-0.00030	0.00030	0.00052	0.00052	0.00001
520.000	447.669	-0.00027	0.00027	0.00053	0.00053	0.00001
530.000	447.569	-0.00032	0.00032	0.00054	0.00054	0.00001
540.000	447.468	-0.00029	0.00029	0.00055	0.00055	0.00001
550.000	447.370	-0.00036	0.00036	0.00056	0.00056	0.00001
560.000	447.270	-0.00036	0.00036	0.00057	0.00057	0.00001
570.000	447.172	-0.00035	0.00035	0.00058	0.00058	0.00001
580.000	447.071	-0.00039	0.00039	0.00059	0.00059	0.00001
590.000	446.971	-0.00042	0.00042	0.00060	0.00060	0.00001
600.000	446.872	-0.00043	0.00043	0.00061	0.00061	0.00001
610.000	446.772	-0.00043	0.00043	0.00062	0.00062	0.00001
620.000	446.673	-0.00045	0.00045	0.00063	0.00063	0.00001
630.000	446.573	-0.00045	0.00045	0.00064	0.00064	0.00001
640.000	446.473	-0.00049	0.00049	0.00065	0.00065	0.00001
650.000	446.373	-0.00049	0.00049	0.00066	0.00066	0.00001
660.000	446.272	-0.00054	0.00054	0.00067	0.00067	0.00001
670.000	446.171	-0.00054	0.00054	0.00068	0.00068	0.00001
680.000	446.070	-0.00052	0.00052	0.00069	0.00069	0.00001
690.000	445.969	-0.00057	0.00057	0.00070	0.00070	0.00001
700.000	445.868	-0.00055	0.00055	0.00071	0.00071	0.00001
710.000	445.769	-0.00060	0.00060	0.00072	0.00072	0.00002
720.000	445.670	-0.00060	0.00060	0.00073	0.00073	0.00002
730.000	445.572	-0.00060	0.00060	0.00074	0.00074	0.00002
740.000	445.471	-0.00066	0.00066	0.00075	0.00075	0.00002
750.000	445.372	-0.00064	0.00064	0.00076	0.00076	0.00002

En primer lugar se renombra cada archivo uno a uno para no perder ninguna información y definir cada experimento del gel. Después, el archivo rawdata (archivo origen del aparato) se guarda en formato de Excel, para poder tratar los datos.

En este archivo Excel, se borran los datos de compresión negativos, ya que significa que el cabezal no ha entrado en contacto aún con el gel. Estos datos son de aproximación de los platos de compresión a la muestra y no ejercen ninguna fuerza de compresión, por eso son negativos.

Con el archivo Excel sin datos nulos, se abre otro archivo Excel con los datos fijos de cada experimento (diámetro, área) y con el dato variable (el espesor).

De los datos respecto al tiempo solo se aprovechan: la carga (N) y extensión (mm). Los siguientes datos (desplazamiento, deformación, lambda, sigma) se obtienen por tratamiento matemático de los datos iniciales:

El desplazamiento se obtiene de la diferencia entre la extensión en ese punto menos la extensión inicial. La deformación es igual al desplazamiento dividido entre el espesor, lambda se obtiene sumando uno a la deformación y sigma (tensión) es igual a la carga dividido por el área de la muestra.

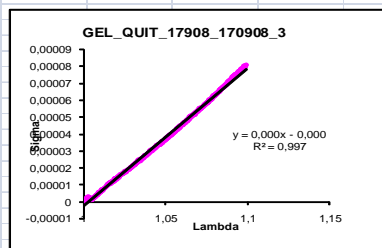
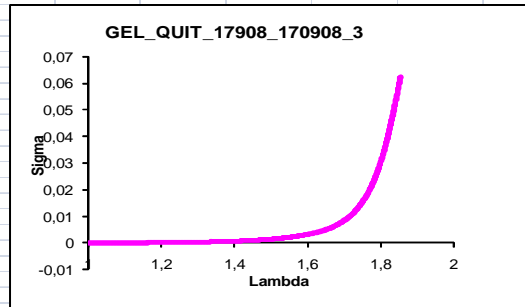
La representación grafica que se lleva a cabo es Sigma vs Lambda. Su objetivo es obtener *la pendiente de la curva* en 3 puntos que se consideran de interés para definir las propiedades mecánicas del gel: al inicio de la grafica (en la mayoría de los casos se hizo otra grafica de Sigma vs Lambda en la parte inicial para obtener mejores datos de *pendientes iniciales*), *al 10% y al 20% de deformación*. Además se obtuvieron otros datos interesantes de la parte final de la curvas de tensión deformación, como la deformación a 4,5 N de carga y la tensión al 25% de deformación. Que se estudie *la pendiente* en esos 3 puntos iniciales (inicial, 10%, 20%) es debido a que a niveles bajos de deformación estamos en el rango lineal del material y no tenemos interferencias de los platos de compresión empleados en los ensayos. Además, estos son los valores de deformación máximos a los cuales podría trabajar el gel en el caso de ser empleado en Ingeniería de tejidos de cartílago.

Como continuación del ejemplo anterior, se muestra el siguiente archivo de datos (.pdf), correspondiente a un ensayo de una de las muestras del gel 1.75% quitosano / NH_3 1M. Este archivo viene codificado como (17908_170908_3). La tabla muestra carga (N), extensión (mm), desplazamiento (adimensional), deformación (mm^{-1}), lambda (mm^{-1}), y sigma (N/mm^2) del ensayo.

También, aparecen tabulados el peso y dimensiones iniciales y finales de la muestra y la deformación a 4,5 N de carga y la tensión al 25% de deformación. El Módulo de Young aparece como inicial, al 10% y 20% de deformación.

Las figura superior de la tabla de datos, muestra la dependencia de Sigma vs Lambda en todo el intervalo del ensayo. Mientras que la inferior muestra la dependencia en la parte inicial del ensayo.

Extensión (mm)	Carga (N)	Desplazamiento	Deformación	Lambda	Sigma	Espesor (mm)	Inicial	Final	4,51169	Módulo de Young	10%	20%	Inicial
4,51169	0	0	0	1	0	Diametro (mm)	Inicial	Final	10	0,00095048	0,00154064	0,0008	
4,5107	0,00003	0,00099	0,00021943	1,00021943	3,8217E-07	Área (mm^2)	Inicial	Final	78,50	0,00029096	Mpa		
4,5097	0,00002	0,00199	0,00044108	1,00044108	2,5478E-07	Peso (gr)	Inicial	Final	0,0199	84,7347668	%		
4,50871	0,00006	0,00298	0,00066051	1,00066051	7,6433E-07								
4,5077	0,00007	0,00399	0,00088437	1,00088437	8,9172E-07								
4,5067	0,00008	0,00499	0,00110602	1,00110602	1,0191E-06								
4,50572	0,00014	0,00597	0,00132323	1,00132323	1,7834E-06								
4,50474	0,00015	0,00695	0,00154044	1,00154044	1,9108E-06								
4,50373	0,00015	0,00796	0,00176431	1,00176431	1,9108E-06								
4,50274	0,00014	0,00895	0,00198374	1,00198374	1,7834E-06								
4,50172	0,0002	0,00997	0,00220981	1,00220981	2,5478E-06								
4,5007	0,00019	0,01099	0,00243589	1,00243589	2,4204E-06								
4,49971	0,0002	0,01198	0,00265532	1,00265532	2,5478E-06								
4,49871	0,0002	0,01298	0,00287697	1,00287697	2,5478E-06								
4,49769	0,00019	0,014	0,00310305	1,00310305	2,4204E-06								
4,49668	0,0002	0,01501	0,00332691	1,00332691	2,5478E-06								
4,49569	0,00018	0,016	0,00354634	1,00354634	2,293E-06								
4,49469	0,00016	0,017	0,00376799	1,00376799	2,0382E-06								
4,49369	0,00013	0,018	0,00398964	1,00398964	1,6561E-06								
4,4927	0,00009	0,01899	0,00420907	1,00420907	1,1465E-06								
4,4917	0,00008	0,01999	0,00443071	1,00443071	1,0191E-06								
4,4907	0,00008	0,02099	0,00465236	1,00465236	1,0191E-06								
4,48971	0,00009	0,02198	0,00487179	1,00487179	1,1465E-06								
4,48873	0,00013	0,02296	0,005089	1,005089	1,6561E-06								
4,48774	0,00011	0,02395	0,00530843	1,00530843	1,4013E-06								
4,48675	0,00015	0,02494	0,00552786	1,00552786	1,9108E-06								
4,48574	0,00017	0,02595	0,00575172	1,00575172	2,1656E-06								
4,48471	0,00016	0,02698	0,00598002	1,00598002	2,0382E-06								
4,48372	0,00019	0,02797	0,00619945	1,00619945	2,4204E-06								
4,48272	0,0002	0,02897	0,0064211	1,0064211	2,5478E-06								
4,48171	0,00023	0,02998	0,00664496	1,00664496	2,9299E-06								
4,4807	0,00023	0,03099	0,00686882	1,00686882	2,9299E-06								
4,47969	0,00025	0,032	0,00709269	1,00709269	3,1847E-06								
4,4787	0,00027	0,03299	0,00731212	1,00731212	3,4395E-06								
4,47768	0,0003	0,03401	0,0075382	1,0075382	3,8217E-06								
4,47669	0,00027	0,035	0,00775763	1,00775763	3,4395E-06								
4,47569	0,00032	0,036	0,00797927	1,00797927	4,0764E-06								
4,47468	0,00029	0,03701	0,00820313	1,00820313	3,6943E-06								
4,4737	0,00036	0,03799	0,00842035	1,00842035	4,586E-06								
4,4727	0,00036	0,03899	0,00864199	1,00864199	4,586E-06								
4,47172	0,00035	0,03997	0,00885921	1,00885921	4,4586E-06								
4,47071	0,00039	0,04098	0,00908307	1,00908307	4,9682E-06								
4,46971	0,00042	0,04198	0,00930472	1,00930472	5,3503E-06								
4,46872	0,00043	0,04297	0,00952415	1,00952415	5,4777E-06								
4,46772	0,00043	0,04397	0,00974579	1,00974579	5,4777E-06								
4,46673	0,00045	0,04496	0,00996522	1,00996522	5,7325E-06								
4,46573	0,00045	0,04596	0,01018687	1,01018687	5,7325E-06								
4,46473	0,00049	0,04696	0,01040852	1,01040852	6,242E-06								
4,46373	0,00049	0,04796	0,01063016	1,01063016	6,242E-06								
4,46272	0,00054	0,04897	0,01085403	1,01085403	6,879E-06								
4,46171	0,00054	0,04998	0,01107789	1,01107789	6,879E-06								
4,4607	0,00052	0,05099	0,01130175	1,01130175	6,6242E-06								
4,45969	0,00057	0,052	0,01152561	1,01152561	7,2611E-06								
4,45868	0,00055	0,05301	0,01174948	1,01174948	7,0064E-06								
4,45769	0,0006	0,054	0,01196891	1,01196891	7,6433E-06								
4,4567	0,0006	0,05499	0,01218834	1,01218834	7,6433E-06								
4,45572	0,0006	0,05597	0,01240555	1,01240555	7,6433E-06								
4,45471	0,00066	0,05698	0,01262941	1,01262941	8,4076E-06								
4,45372	0,00064	0,05797	0,01284884	1,01284884	8,1529E-06								
4,45272	0,00066	0,05897	0,01307049	1,01307049	8,4076E-06								
4,45171	0,00068	0,05998	0,01329435	1,01329435	8,6624E-06								
4,45071	0,00069	0,06098	0,013516	1,013516	8,7898E-06								
4,4497	0,0007	0,06199	0,01373986	1,01373986	8,9172E-06								
4,4487	0,00073	0,06299	0,01396151	1,01396151	9,2994E-06								
4,44771	0,00074	0,06398	0,01418094	1,01418094	9,4268E-06								
4,4467	0,00076	0,06499	0,0144048	1,0144048	9,6815E-06								
4,44569	0,0008	0,066	0,01462866	1,01462866	1,0191E-05								
4,44469	0,0008	0,067	0,01485031	1,01485031	1,0191E-05								
4,44369	0,0008	0,068	0,01507196	1,01507196	1,0191E-05								
4,44269	0,00086	0,069	0,0152936	1,0152936	1,0955E-05								
4,44168	0,00083	0,07001	0,01551747	1,01551747	1,0573E-05								
4,4407	0,00086	0,07099	0,01573468	1,01573468	1,0955E-05								
4,43971	0,00084	0,07198	0,01595411	1,01595411	1,0701E-05								
4,43872	0,00089	0,07297	0,01617354	1,01617354	1,1338E-05								
4,43771	0,00087	0,07398	0,0163974	1,0163974	1,1083E-05								
4,43672	0,00087	0,07497	0,01661683	1,01661683	1,1083E-05								
4,43572	0,00087	0,07597	0,01683848	1,01683848	1,1083E-05								
4,43472	0,00088	0,07697	0,01706013	1,01706013	1,121E-05								
4,43371	0,00094	0,07798	0,01728399	1,01728399	1,1975E-05								
4,43268	0,00091	0,07901	0,01751228	1,01751228	1,1592E-05								
4,43171	0,00095	0,07998	0,01772728	1,01772728	1,2102E-05								
4,43071	0,00095	0,08098	0,01794893	1,01794893	1,2102E-05								
4,4297	0,00094	0,08199	0,01817279	1,01817279	1,1975E-05								
4,42869	0,00099	0,083	0,01839665	1,01839665	1,2611E-05								
4,42769	0,00098	0,084	0,0186183	1,0186183	1,2484E-05								
4,42669	0,00095	0,085	0,01883995	1,01883995	1,2102E-05								
4,42569	0,00106	0,086	0,01906159	1,01906159	1,3503E-05								
4,4247	0,00106	0,08699	0,01928102	1,01928102	1,3503E-05								
4,42371	0,00107	0,08798	0,01950045	1,01950045	1,3631E-05								
4,42273	0,00109	0,08896	0,01971767	1,01971767	1,3885E-05								
4,42173	0,00105	0,08996	0,01993931	1,01993931	1,3376E-05								



Una vez obtenidos los datos de cada ensayo, renombrarlos, tratar los datos y graficarlos, el siguiente paso fue crear un archivo Excel con todos los experimentos de de cada grupo de geles estudiados

por muestra de gel). En estas páginas se muestran los datos de cada experimento (modulo de Young inicial, al 10% y 20% de deformación, la deformación a 4,5 N de carga y la tensión al 25% de deformación) y también el promedio, desviación estándar y error típico de los diferentes módulos obtenidos en las 3 partes de estudio (inicial, 10% y 20%).

Después de obtener los promedios de los diferentes módulos de cada gel, se agrupan todos los geles con sus resultados en la última parte del libro Excel. Los resultados tabulados son los siguientes: módulo de Young, módulo tangente al 10% y al 20%, con su promedio, desviación estándar y error típico de cada grupo de geles.

Como ejemplo, la siguiente tabla muestra los datos del archivo Excel de los 6 ensayos realizados durante la caracterización del gel 5% quitosano / NH_3 1M. Pueden verse los valores del modulo de Young inicial, al 10% y 20% de deformación, de la deformación a 4,5 N de carga, de la tensión al 25% de deformación y del promedio, desviación estándar y error de los diferentes módulos.

GEL_QUIT_17408_110908_1

	0,1	0,2	Pendiente i		10%	20%	Pendiente i
Módulo de Young	0,03079073	0,05533362	0,0114	Promedio	0,02415512	0,04563814	0,01026667
				Desv Stand	0,00568034	0,00679838	0,00432188
Tensión a 25% de def	0,00929389	Mpa		Error típico	0,00231899	0,00277543	0,0017644
Def a 4,5 N	50,7443885	%					

GEL_QUIT_17408_110908_2

	0,1	0,2	Pendiente i	Quitosano			5%
Módulo de Young	0,01650097	0,044597	0,0063	Agente Neutralizador	NH3	1 M	
Tensión a 25% de def	0,0065772	Mpa					
Def a 4,5 N	51,3622616	%					

GEL_QUIT_17408_110908_3

	0,1	0,2	Pendiente i
Módulo de Young	0,02246605	0,05119231	0,0068
Tensión a 25% de def	0,00781376	Mpa	
Def a 4,5 N	50,7983579	%	

GEL_QUIT_17408_110908_4

	0,1	0,2	Pendiente i
Módulo de Young	0,03102332	0,0459165	0,0178
Tensión a 25% de def	0,00899083	Mpa	
Def a 4,5 N	53,3293651	%	

GEL_QUIT_17408_110908_5

	0,1	0,2	Pendiente i
Módulo de Young	0,02220517	0,03812767	0,0078
Tensión a 25% de def	0,00676892	Mpa	
Def a 4,5 N	57,2450671	%	

GEL_QUIT_17408_110908_6

	0,1	0,2	Pendiente i
Módulo de Young	0,02194451	0,03866175	0,0115
Tensión a 25% de def	0,00663236	Mpa	
Def a 4,5 N	56,0251709	%	

La siguiente tabla muestra los valores (Mpa) de los promedios de los diferentes módulos de cada gel estudiado. En particular aparecen tabulados los siguientes: módulo de Young (Pendiente inicial), módulo tangente al 10% y al 20%, con su promedio, desviación estándar y error típico de cada grupo de geles.

	<u>Promedio</u>			<u>Desv</u>			<u>Error</u>		
	P inicial	10%	20%	P inicial	10%	20%	P inicial	10%	20%
16908	0,00188571	0,00324794	0,00476369	0,00138852	0,00229109	0,00332487	0,00062097	0,00102461	0,00148693
17008	0,00322	0,00545428	0,01061254	0,00063797	0,0016115	0,00402291	0,00028531	0,00072068	0,0017991
17108	0,00148	0,00169096	0,00234549	0,00038987	0,00044897	0,00071439	0,00017436	0,00020079	0,00031948
17208	0,00275	0,00357199	0,0061051	0,00050892	0,00056855	0,00110744	0,00020777	0,00023211	0,00045211
17308	0,00235	0,00308582	0,00477121	0,00054681	0,00048943	0,00066179	0,00022323	0,00019981	0,00027017
17408	0,01026667	0,02415512	0,04563814	0,00432188	0,00568034	0,00679838	0,0017644	0,00231899	0,00277543
17508	0,012	0,02539543	0,03034526	0,00700179	0,00489941	0,00561353	0,00313129	0,00219108	0,00251045
17608	0,00116	0,00121323	0,0016952	0,00019494	0,0005139	0,0006122	7,3679E-05	0,00019424	0,00023139
17708	0,00566667	0,00868046	0,01642543	0,00345871	0,00260733	0,00183629	0,00141201	0,00106444	0,00074966
17808	0,02743333	0,02496421	0,03984214	0,02535963	0,00692777	0,00938123	0,01035302	0,00282825	0,00382987
17908	0,00076667	0,00090815	0,00139248	0,00015055	0,00013141	0,00024333	6,1464E-05	5,3646E-05	9,9338E-05
18008	0,00076667	0,0008715	0,00132104	0,00010328	0,00011161	0,00021316	4,2164E-05	4,5564E-05	8,7023E-05
18108	0,00188571	0,00240293	0,00363066	0,00041404	0,00038838	0,0005749	0,00015649	0,0001468	0,00021729
18208	0,00065	0,00068688	0,00103349	0,00028107	0,00025175	0,00038562	0,00011475	0,00010278	0,00015743
18308	0,00055	0,00063993	0,00099922	0,00010488	0,00010872	0,00024803	4,2817E-05	4,4383E-05	0,00010126
18408	0,00088333	0,00105577	0,00150287	0,0001472	0,00017443	0,00013911	6,0093E-05	7,1212E-05	5,679E-05
18508	0,00046667	0,00046564	0,00077059	8,165E-05	0,00014717	0,00014524	3,3333E-05	6,0082E-05	5,9293E-05
18608	0,00198333	0,00241005	0,00372418	0,00055648	0,00067021	0,00097648	0,00022718	0,00027361	0,00039865

El significado de los códigos asignados a los geles es el siguiente:

Codigos de Geles

16908 : Gel del 1.75% de quitosano neutralizado con glicerosfato disódico y gelificado a 73°C. El ensayo se realizo a 10°C.
 17008: Gel del 2% de quitosano neutralizado con glicerosfato disódico y gelificado a 73°C. El ensayo se realizo a 10°C.
 17108: Gel del 1.5% de quitosano neutralizado con glicerosfato disódico y gelificado a 73°C. El ensayo se realizo a 10°C.
 17208 : Gel del 2% de quitosano neutralizado\gelificado con amoniaco 0.1 M endurecido con NaOH al 20%.
 17308 :Gel del 3% de quitosano neutralizado\gelificado con amoniaco 1 M endurecido con agua destilada a 100 °C.
 17408 ::Gel del 5% de quitosano neutralizado\gelificado con amoniaco 1 M endurecido con agua destilada a 100 °C.
 17508 :Gel del 2% de quitosano neutralizado\gelificado con amoniaco 1 M endurecido con NaOH al 20%.
 17608 ::Gel del 2% de quitosano neutralizado\gelificado con amoniaco 1 M envejecido 4 dias en el frigorifico.
 17708 : Gel del 3% de quitosano neutralizado\gelificado con amoniaco 0.1 M
 17808 : Gel del 5% de quitosano neutralizado\gelificado con amoniaco 1 M.
 17908 :Gel del 1,75% de quitosano neutralizado\gelificado con amoniaco 1 M.
 18008 :Gel del 1,6% de quitosano neutralizado\gelificado con amoniaco 1 M.
 18108 : Gel del 2% de quitosano neutralizado\gelificado con amoniaco 1 M.
 18208:Gel del 1% de quitosano neutralizado\gelificado con amoniaco 1 M.
 18308 :Gel de l1,25% de quitosano neutralizado\gelificado con amoniaco 1 M. Q1.25% 1M R
 18408:Gel del 1,75% de quitosano neutralizado\gelificado con amoniaco 1 M.
 18508:Gel del 1,5% de quitosano neutralizado\gelificado con amoniaco 1 M.
 18608 : Gel del 4% de quitosano neutralizado\gelificado con amoniaco 1 M.

7.4.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS ENSAYOS MECÁNICOS.

Todos los resultados obtenidos en los estudios mecánicos se adjuntan en el CD de este PFC en la carpeta ANEXO y con un resumen en una hoja EXCEL. Debido al elevado espacio que ocupan no se presentan en papel impreso. Para la discusión emplearemos la última tabla resumen de resultados del apartado anterior.

En esta última tabla del apartado anterior, se muestran los valores (Mpa) de los promedios de los diferentes módulos de cada gel estudiado. En particular: el módulo de Young (pendiente inicial) y módulo tangente al 10% y al 20% para cada grupo de geles.

En dicha tabla, puede apreciarse que todos los geles estudiados presentan una modulo inicial, uno o varios órdenes de magnitud inferior a la necesaria para el cultivo celular de cartílago, que es 0.4 Mpa.

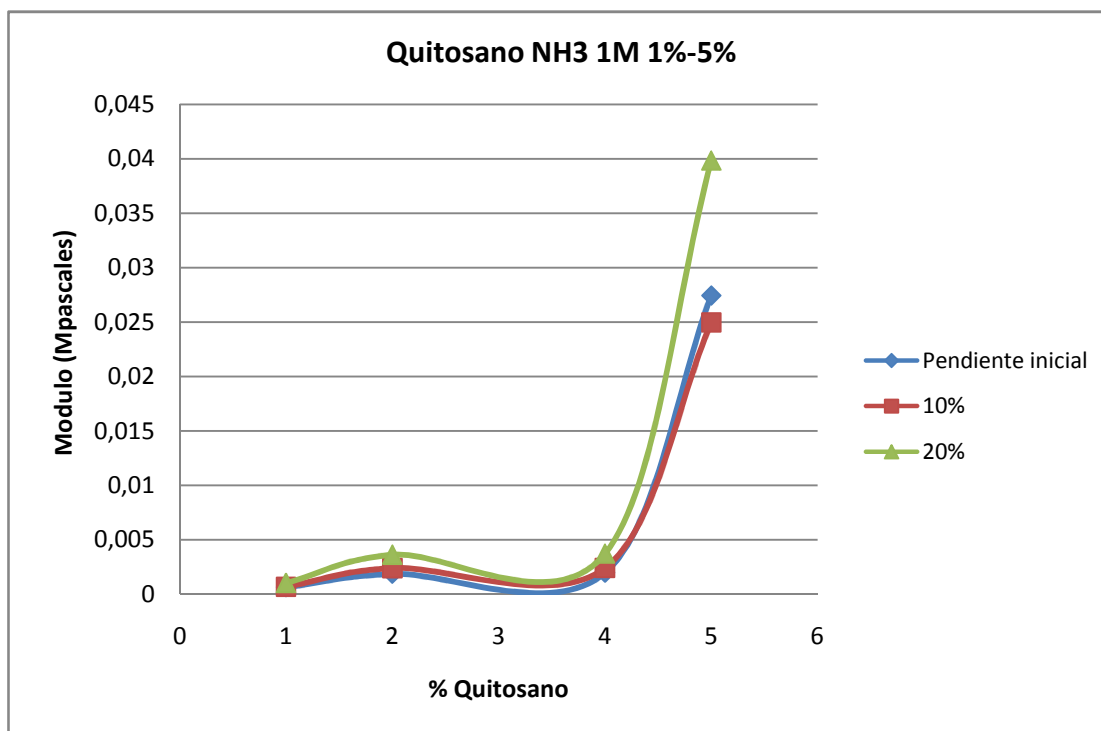
Los tres máximos valores obtenidos son aproximadamente 0.0274, 0.012 y 0.0102 Mpa, correspondientes a los geles 17808, 17508 y 17408, respectivamente. El primero de estos dos geles contiene 5% de quitosano / NH_3 1M y el tercero, es el mismo gel sometido a endurecimiento térmico que consiste en calentarlo sumergido en agua destilada durante 10 minutos a 100°C. El segundo contiene 2% de quitosano / NH_3 1M sometido a endurecimiento termoquímico que consiste en calentarlo sumergido en NaOH 20% durante 10 minutos a 100°C.

El valor máximo corresponde al gel con la mayor concentración de quitosano 5%. Sin embargo, el tratamiento térmico de este gel no aumenta este valor sino que lo reduce considerablemente. Este resultado, indica que este tratamiento térmico no es efectivo como endurecedor de estos geles (que más bien son precipitados gelatinosos) que contienen concentraciones de quitosano elevadas. Sin embargo, el endurecimiento termoquímico aplicado al gel de concentración moderada de quitosano 2%, resulta muy efectivo y de hecho produce el segundo gel que presenta mayor modulo inicial.

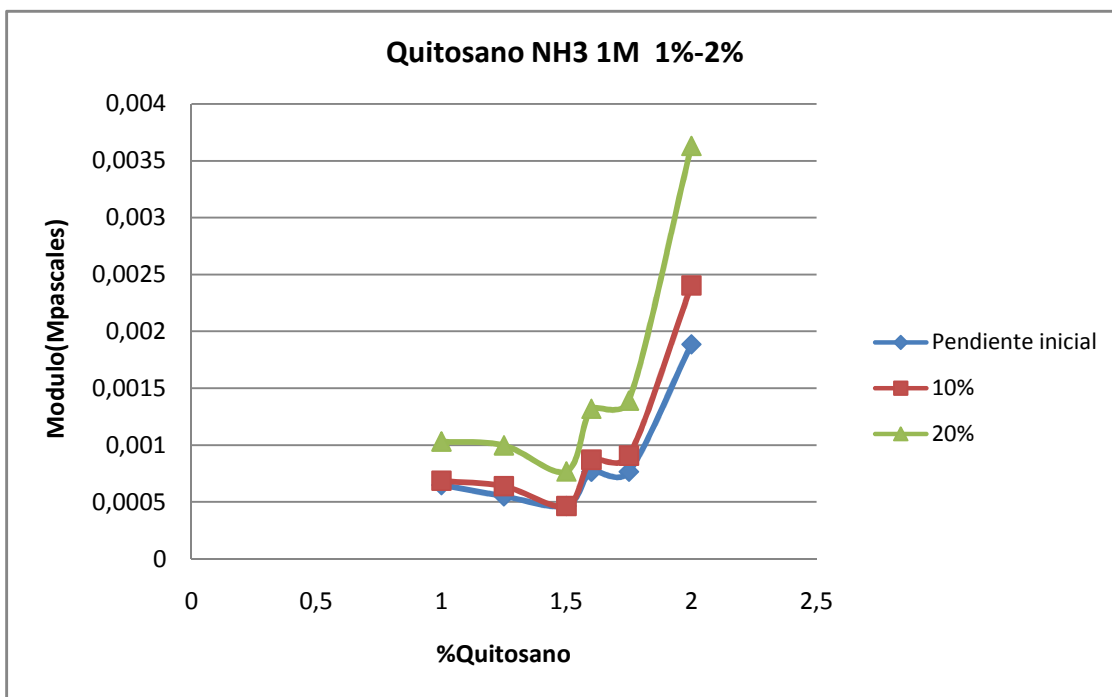
Como era previsible, los menores valores de pendiente inicial (entre 0.00046 y 0.00088 Mpa) corresponden a los geles de menor concentración de quitosano (entre 1 y 1.75%) / NH_3 1M, sin ser sometidos a ningún proceso de endurecimiento. Por el contrario, geles neutralizados con glicerofosfato disódico de concentraciones de quitosano similares, 1.5 y 1.75%, muestran valores un orden de magnitud superiores 0.0014 y 0.0018, respectivamente. Este resultado indica que el glicerofosfato disódico es un agente neutralizante más conveniente que el NH_3 1M. Desafortunadamente, el proceso de gelificación cuando se emplea glicerofosfato disódico, implica elevadas temperaturas incompatibles con el cultivo celular.

La siguiente figura muestra la dependencia de los módulos promedio (inicial, 10 y 20%) (valores Mpa de la última tabla de la sección anterior) con el % quitosano, para geles del 1 a 5% de quitosano / NH_3 1M. Puede observarse, que hasta el 4% de quitosano los módulos son muy parecidos y que a partir del 4% se produce un aumento exponencial de los módulos. Este tendencia, puede explicarse si tenemos en cuenta que los geles con concentraciones de quitosano tan elevadas > 4%, se consideran más precipitados gelatinosos que geles propiamente dichos y su comportamiento mecánico suele ser considerablemente diferente del característico de un gel.

En esta misma figura, puede apreciarse que existe un máximo muy discreto a 2% de quitosano. Este resultado señala al gel 2% de quitosano / NH_3 1M como uno de los más interesantes. De hecho, muchos de los resultados de los estudios mecánicos que discutiremos a continuación, se obtuvieron con este gel (preparado con diferentes neutralizantes y/o procesos de endurecimiento).

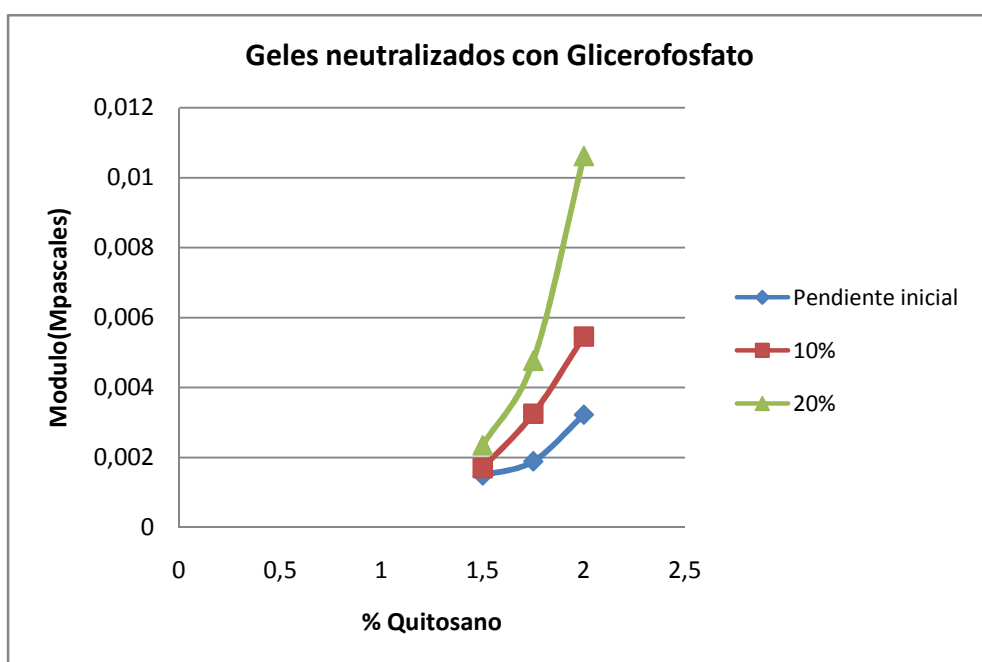


La siguiente figura muestra la dependencia de los módulos promedio (inicial, 10 y 20%) (valores Mpa de la última tabla de la sección anterior) con el % quitosano, para geles del 1 al 2% de quitosano / NH_3 1M. Puede observarse, que hasta el 2% de quitosano los valores de los módulos son parecidos y muy bajos aproximadamente dos órdenes de magnitud inferiores al ideal de 0.4 Mpa. Sin embargo, para el 2% estos valores aumentan aproximadamente un orden de magnitud.

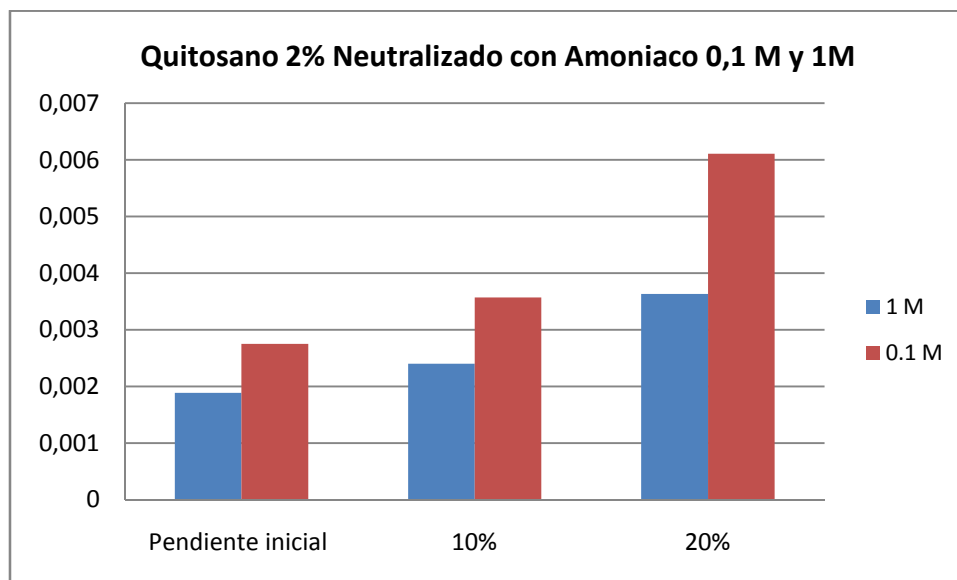


La siguiente figura muestra la dependencia de los módulos promedio (inicial, 10 y 20%) (valores Mpa de la última tabla de la sección anterior) con el % quitosano, para geles del 1,5, 1,75 y 2% de quitosano, neutralizados con glicerofosfato disódico. Puede observarse, que la tendencia es muy similar a la mostrada en la figura anterior para geles de igual concentración de quitosano pero neutralizados con NH₃.

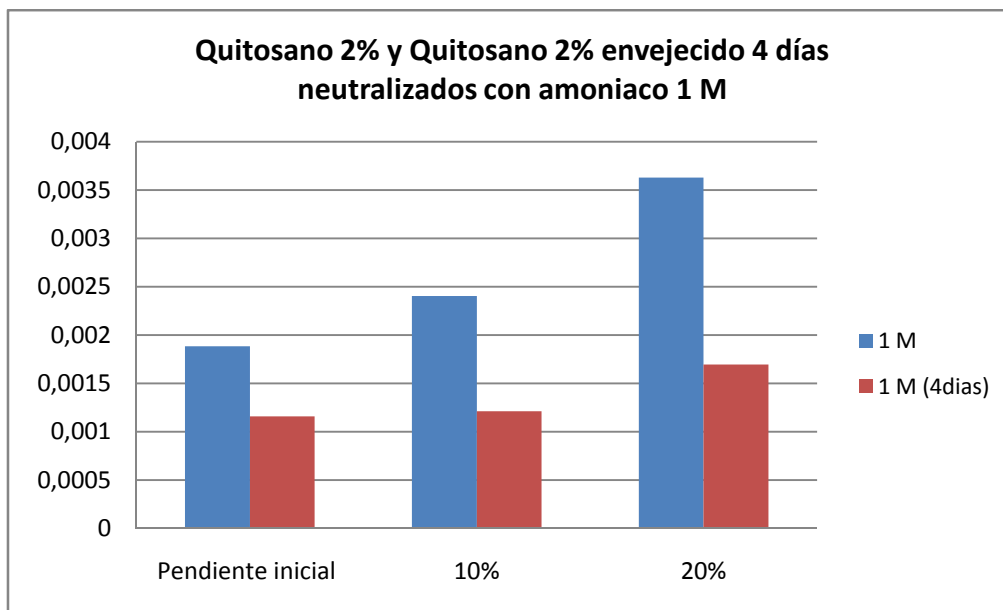
Sin embargo, los geles neutralizados con glicerofosfato disódico muestran valores de aproximadamente un orden de magnitud superiores a los neutralizados con NH₃ 1M. El glicerofosfato disódico podría resultar un agente neutralizante más conveniente que el NH₃ 1M, de no ser por las elevadas temperaturas de su proceso de gelificación.



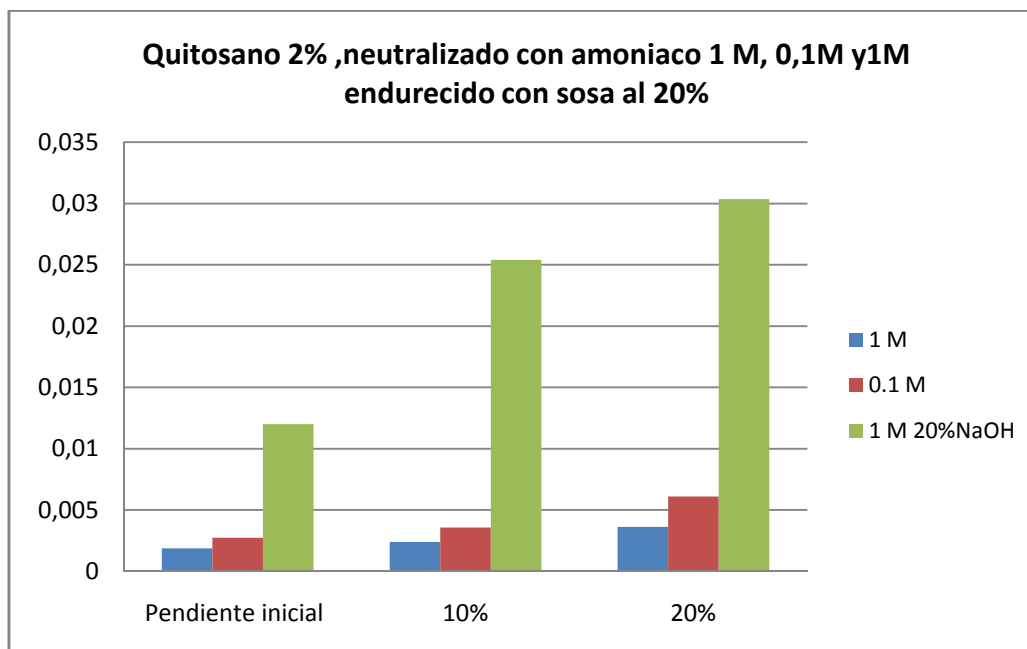
La siguiente figura muestra una representación comparativa de los valores en Mpa de los módulos inicial, 10% y 20% de dos geles de quitosano al 2%. Uno de estos geles fue neutralizado con NH_3 1 M y el otro con NH_3 0.1 M. Puede observarse, que los valores de los 3 módulos del neutralizado con NH_3 0.1 M son considerablemente mayores que los correspondientes del neutralizado con NH_3 1 M. Sin embargo, la neutralización con NH_3 0.1 M es demasiado lenta para resultar practica, a pesar de que conduce a la obtención de geles más homogéneos y resistentes que la de NH_3 1 M.



La siguiente figura muestra una representación comparativa de los valores en Mpa de los módulos inicial, 10% y 20% de dos geles de quitosano 2% / NH_3 1 M. Uno de estos geles fue preparado con una disolución de quitosano al 2% en HCl 0.1M recién preparada, mientras que para el otro se empleo la misma disolución pero 92h después de su preparación. Puede observarse, que los valores de los 3 módulos del obtenido con la disolución de quitosano recién preparada son considerablemente mayores que los correspondientes al preparado con la disolución envejecida durante 4 días. Este resultado es debido a la degradación del peso molecular del quitosano en la disolución ácida.



La siguiente figura muestra una representación comparativa de los valores en Mpa de los módulos inicial, 10% y 20% de tres geles de quitosano 2%. Dos neutralizados con NH_3 1 M y el otro con NH_3 0.1 M. Uno de los dos primeros fue sometido a endurecimiento termoquímico que consiste en calentarlo sumergido en NaOH 20% durante 10 minutos a 100°C. Puede observarse, que los valores de los 3 módulos del sometido a endurecimiento termoquímico son más de un orden de magnitud superior a los correspondientes de los no endurecidos.



8.- ENSAYOS DE CULTIVO CELULAR EN LOS HIDROGELES DE QUITOSANO OBTENIDOS.

8.1.- INTRODUCCIÓN.

Se realizó un experimento tentativo, para observar la viabilidad de los hidrogeles de quitosano en un sustrato de cultivo de células para la aplicación en ingeniería de cartílagos. Se determinó que el cultivo fuese superficial ya que en un cultivo en el interior del gel surgen varios problemas que lo hacían inviable, algunos de estos problemas eran como obtener una disolución sin gelificar y luego gelificar sin dañar las células cultivadas o como mantener el pH neutro durante todos los procesos.

El tipo de célula a cultivar fue con células madre mesenquimales y el medio de cultivo era un líquido rosáceo compuesto por líquido llamado alfamem más 10% de FBS (suero fetal bovino) y más 1% de antibiótico.

Una vez determinado las características del cultivo, se determinó las características del hidrogel, en ese momento se pensó que el más viable era el gel de 2% de quitosano y neutralizado/gelificado por NH_3 1 M, esto fue en parte debido a la facilidad para adaptarlo al cultivo superficial y que se formaban geles uniformes.

8.2.- PREPARACION DE LOS HIDROGELES PARA EL CULTIVO DE CELULAS

Para poder mantener la esterilidad necesaria para realizar los cultivos celulares se esterilizaron todos los instrumentos habituales utilizados para la fabricación de los geles en un autoclave, esto es un recipiente en forma de cubo que controla la presión y la temperatura y nos permite alcanzar valores de temperatura $\approx 130^\circ\text{C}$ que garantizan la esterilidad de los materiales. Una vez esterilizado el material se guardó durante un periodo de tiempo de aproximadamente 24 horas en una campana biológica de flujo laminar que mantiene estéril todos los instrumentos mediante una cortina de aire que impide la penetración de agentes contaminantes y por medio de luz ultravioleta.

El primer paso del experimento comenzó disolviendo el quitosano por medio de ácido acético 0,5% (50 ml) en un vaso de precipitados de 100mL, se mantuvo en agitación durante unos minutos hasta que se comprobó a simple vista que se había disuelto todo el quitosano.

Una vez disuelto todo el quitosano se depositan en unas placas de cultivo, todos estos procesos se realizaron sin sacar nada de la campana, ni instrumentos ni los brazos de la campana porque esto podría contaminar el gel.



Geles formados en sus moldes, neutralizados con NH_3 1 M y lavados con agua destilada hasta alcanzar pH neutro. Preparados para obtener muestras de las partes más uniformes del gel con un sacabocados.

Una vez disueltos el quitosano se neutralizo con vapor de NH_3 1 M, esto se llevo a cabo en un recipiente cerrado con un vaso con NH_3 y las placas de cultivo, durante 24-48 horas, no se neutralizo más tiempo ya que el cultivo de células era en la superficie, que es la primera parte del gel que se neutraliza.

Luego se lavaron (sin sacar de los moldes) cada 24 horas cambiando el agua destilada durante un tiempo de 6 o 7 días, el lavado fue más largo porque era fundamental que el pH fuese muy cercano a 7 para permitir el crecimiento de las células.

Su almacenamiento se produjo en la campana biológica con luz ultravioleta para mantener la esterilidad, y en menos de 24 horas se ensayo el cultivo.

Al final se depositaron las células en la superficie del gel, el estudio duro 1 semana aproximadamente y no se observaron células viables en la superficie (menos de un 10%) a pesar de mantener valores de pH compatibles con la viabilidad celular. El principal problema es posible (porque no se hizo un estudio profundo) que fuese la toxicidad de la muestra o los bajos valores de rigidez del quitosano.

9.- CONCLUSIONES

En el presente Proyecto se muestra la no viabilidad de hidrogeles de quitosano para la aplicación en ingeniería de cartílago en las condiciones definidas. El PFC tiene como objetivo estudiar las distintas concentraciones de quitosano y diferentes procesos de gelificación, llegando a las siguientes conclusiones:

- El quitosano no es soluble en agua a pHs neutros o básicos, pero sí que se disuelve a pHs ácidos, debido a que sus grupos amino ($-\text{NH}_2$) forman las sales de amonio correspondientes ($-\text{NH}_3^+$).
- Cuando se utiliza glicerofosfato disódico como agente neutralizante, la formación del hidrogel no se produce a temperatura ambiente al alcanzar pH neutro o fisiológico, sino que es necesario calentar la disolución acuosa neutralizada para que se produzca su gelificación.
- Es importante evitar concentraciones altas de ácidos al disolver ya que producen una degradación significativa de las cadenas de quitosano (disminución de su peso molecular).
- Debido a las viscosidades tan elevadas, la preparación de las disoluciones más concentradas (5%) la agitación magnética puede resultar imposible por lo que en estos casos se emplea agitación mecánica.
- El almacenamiento prolongado de las disoluciones, conducen a la degradación de las cadenas quitosano. La disminución de su peso molecular en estas condiciones resulta muy evidente, debido a que la disminución de la viscosidad de las disoluciones se aprecia fácilmente a simple vista.
- Las disoluciones de quitosano de concentración $< 1\%$ no gelifican o producen geles muy débiles que pierden fácilmente su cohesión resultando imposibles de manipular.
- Las disoluciones de quitosano de concentración $> 2-3\%$ generan hidrogeles que mecánicamente se parecen a elastómeros resistentes, similares a gomas de caucho.
- En la neutralización con NaOH, la disolución de quitosano tiende mezclarse con la de NaOH produciendo geles poco homogéneos y uniformes, difíciles de manipular.
- Cuanto menor es la concentración de NH_4OH más lenta es la neutralización, pero más homogéneo resulta el hidrogel obtenido.
- La gelificación con glicerofosfato es reversible, los geles se licuan al ser enfriados a $5-10^\circ\text{C}$ en el frigorífico.
- El endurecimiento con NaOH 20% (incluso a bajas temperaturas $5-10^\circ\text{C}$), los geles es tan notablemente que llegan a convertirse en elastómeros

similares al caucho común. Su valor de resistencia mecánica es más de un orden de magnitud superior a los correspondientes geles no endurecidos.

- Los geles neutralizados con glicerofosfato disódico muestran valores de resistencia mecánica aproximadamente un orden de magnitud superior a los neutralizados con NH_3 1M. El glicerofosfato disódico podría resultar un agente neutralizante más conveniente que el NH_3 1M, de no ser por las elevadas temperaturas de su proceso de gelificación
- La neutralización con NH_3 0.1 M es demasiado lenta para resultar practica, a pesar de que conduce a la obtención de geles más homogéneos y resistentes que la de NH_3 1 M.
- Ninguno de los geles estudiados presento suficiente resistencia mecánica para el cultivo celular de cartílago.

10.- BIBLIOGRAFIA

1. Jaepyoung Cho, Marie-Claude Heuzey, Andre Begin, Pierre J. Carreau *Chitosan and glycerophosphate concentration dependence of solution behaviour and gel point using small amplitude oscillatory rheometry*. Food Hydrocolloids 20 (2006) 936–945
2. Goicoolea, F., *Métodos de aislamiento y caracterización de las propiedades físicoquímicas*. Taller "Química de Quitina y Quitosanos y su Aplicación en Control Ambiental". Bahía Blanca, Argentina, 2001: p. 70.
3. Méndez, A. and D. Oviedo, Informe Científico-Técnico, IQBE, ACC, 1978. **144**: p. 14.
4. Beaney, P., J. Lizardi-Mendoza, and M. Healy, *Comparison of Chitins Produced by Chemical and Bioprocessing Methods*. J. Chem. Technol. Biotechnol., 2005. **80**(2): p. 145-150.
5. Roberts, G.A.F., *Chitin Chemistry*. 1992, London: The Macmillan Press Ltd.
6. No, H.K. and P. Meyers, *Preparation of chitin and chitosan*, in *Chitin Handbook*, R.A.A. Muzarelli and M.G. Peter, Editors. 1997, European Chitin Society: Grottammare. p. 475-489.
7. Muzzarelli, R.A.A., *Chitin*. 1977, Oxford: Pergamon Press.
8. Synowiecki, J., *The recovery of protein hydrolyzate during enzymatic isolation of chitin from shrimp Crangon processing discard*. Food Chem., 2000. **68**(2): p. 147-52.
9. Austin, P.R., et al., *Chitin: new facets of research*. Science, 1981. **212**(4496): p. 749-753.
10. Acosta, N., et al., *Extraction and characterization of chitin from crustaceans*. Biomass and Bioenergy, 1993. **5**: p. 145-153.
11. Peniche, C., et al., *Influencia de Algunos Parámetros en la Obtención de Quitosana y sus Características*. Bioorg. Khimia, 1984. **1**(9): p. 1248-1252.
12. Tsaih, M.L. and R.H. Chen, *The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan*. J. Appl. Polym. Sci., 2003. **88**: p. 2917-2923.
13. Muzzarelli, R.A.A., *Natural Chelating Polymers*, A. Press, Editor. 1973: New York. p.134.
14. Sannan, T., K. Kurita, and Y. Iwakura, *Studies on Chitin, 2) Effect of deacetylation on solubility*. Makromol. Chem., 1976. **177**: p. 3589-3600.
15. Roberts, G.A.F., *Chitosan production routes and their role in determining the structure*

and properties of the product, in *Advances in Chitin Science*, A. Domard, G.A.F. Roberts, and K.M. Vårum, Editors. 1998, Jacques André Publisher: Lyon. p. 22-31.

16. Goycoolea, F.M., et al., *Preparation of chitosan from squid (Loligo spp.) pen by a microwave accelerated thermochemical process*, in *Advances in Chitin Science*, A. Domard, G.A.F. Roberts, and K.M. Vårum, Editors. 1998, Jacques André Publisher: Lyon.p. 78-83.

17. Pelletier, A., et al., *Chitin/chitosan transformation by thermo-mechano-chemical treatment including characterization by enzymatic depolymerization*. Biotechnol. Bioeng., 1990. **36**(3): p. 310-315.

18. García-Alonso, I., et al., *Método para el Aprovechamiento del Desecho de la Langosta Común*. 1983, Instituto de Química y Biología Experimental:Cuba. p. 9.

19. Inoue, Y., *NMR Determination of the Degree of Acetylation*, in *Chitin Handbook*, R.A.A Muzzarelli and M.G. Peter, Editors. 1997, European Chitin Society: Grottammare. p. 133-136.

20. Muzzarelli, R.A.A. and R. Rochetti, *Determination of the degree of N-acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry*. Carbohydr. Polym, 1985. **5**: p.461-472.

21. Muzzarelli, R.A.A., et al., *Methods for the Determination of the Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan*, in *Chitin Handbook*, y.M.G.P. R.A.A. Muzzarelli, Editor. 1997, European Chitin Society: Grottammare. p. 109-119.

22. García, I., C. Peniche, and J.M. Nieto, *Determination of the Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan by Thermal Analysis*. Journal of Thermal Analysis, 1983. **28**: p. 189-193.

23. Aiba, S.-I., *Studies on chitosan:1. Determination of the degree of N-acetylation of chitosan by ultraviolet spectrophotometry and gel permeation chromatography*. Int. J. Biol..Macromol., 1986. **8**(3): p. 173-176.

24. K.E. Crompton , J.D. Goud , R.V. Bellamkonda , T.R. Gengenbac, D.I. Finkelstein , M.K. Horne , J.S. Forsythe. *Polylysine-functionalised thermoresponsive chitosan hydrogel for neural tissue engineering*.

25. Crescenzi, V., Imbriaco D., Lárez C., Dentini M. y Ciferri A., *Macromol, Chem. Phys.* 196, 2873-2880 (1995).

26. K.E. Crompton,a, R.J. Prankerdc, D.M. Paganina, T.F. Scotta, M.K. Horned,D.I. Finkelsteind, K.A. Grossa, J.S. Forsythea. *Morphology and gelation of thermosensitive chitosan hydrogels*. Biophysical Chemistry 117 (2005) 47 – 53.

27. Mingyu Cheng, Jinguang Deng, Fei Yang, Yandao Gong, Nanming Zhao, Xiufang Zhang. *Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions*. Biomaterials 24 (2003) 2871–2880.