

## EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO FÚNGICO EXPERIMENTAL Y COMERCIAL, COMO POTENCIAL BIOMATERIAL PARA APLICACIONES EN INGENIERÍA DE TEJIDOS

Luisa F. Alzate<sup>1\*</sup>, Raúl A. Cuervo<sup>2</sup>, Mayra E. Valencia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de ingeniería de materiales, Universidad San Buenaventura, Cali, Colombia. Correo electrónico: Lnice33@hotmail.com

<sup>2</sup> Programa de ingeniería agroindustrial, Universidad San Buenaventura, Cali, Colombia.

*Recibido: Noviembre de 2014; Aceptado: Febrero 2015*

### RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se llevó a cabo la caracterización y evaluación del quitosano tanto comercial como experimental. Para este último se realizó inicialmente un aislamiento, crecimiento, multiplicación de esporas e identificación macro y microscópica del hongo *Aspergillus niger*, para luego extraer el quitosano de las paredes celulares del mismo, mediante procesos altamente ácidos y básicos. Se obtuvo un grado de desacetilación de 93,5 y 92,5% para el quitosano experimental y comercial respectivamente. Ambos quitosanos fueron caracterizados por medio de análisis químicos y térmicos, y posteriormente se llevó a cabo el proceso de conformado por el método de electrohilado. Se logró obtener películas únicamente con el quitosano comercial, formadas por fibras continuas con diámetros inferiores a 1 µm, las cuales generaron una membrana tridimensional altamente porosa que podría ser utilizada como matriz para el crecimiento de tejidos.

**Palabras clave:** *Aspergillus niger*, quitosano, andamios, electrohilado.

### ABSTRACT

In the present research work was carried out the characterization and evaluation of commercial and experimental chitosan. For The latter isolation, growth, multiplication and macro and microscopic spores of the fungus *Aspergillus niger* was carried out initially identification, then extract the chitosan of the cell walls, there or by highly acidic and basic processes. The deacetylation degree of 93.5 and 92.5% was obtained for the experimental and commercial chitosan respectively. Both chitosan were characterized by thermal and chemical analysis and the carried out the forming process by electrospinning method. It was possible to obtain films only with commercial chitosan, consisting of continuous fibers with diameters less than 1 micron, which generated a highly porous three-dimensional membrane that could be used as a scaffold for tissue growth.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, chitosan, scaffolds, electrospinning.

### INTRODUCCIÓN

El quitosano es el segundo polisacárido más abundante que se encuentra en la naturaleza, siendo poseedor de excelentes propiedades mecánicas, las cuales permiten la formación de fibras y películas, y es además un recurso renovable, con la gran ventaja de no ser un agente contaminante. (Chávez et al 2012)[].

Cabe mencionar las propiedades biológicas que lo hacen el biopolímero con mayor uso en investigaciones relacionadas con andamios y matrices de crecimiento en estos últimos años, tales

como: biocompatibilidad, aceleración en la formación de osteoblastos, hemostático, fungistático, espermatocida, anticolesterémico, depresor del sistema nervioso central, entre otros (Shirai et al 2011)[]. En general, el quitosano posee propiedades tales como actividad bactericida, fúngica y antiviral, también sirve como matriz para la liberación controlada de agroquímicos y fármacos, tratamiento de aguas, cosméticos, e industria del papel, es además biodegradable y biocompatible, lo cual lo hace muy atractivo para su estudio en aplicaciones biomédicas (Hernandez, 2004)[].

El hongo *Aspergillus niger* así como algunos otros hongos, contienen en su pared celular biopolímeros quitinosos, principalmente la quitina, de la cual se obtiene quitosano mediante el proceso de desacetilación. El quitosano obtenido a partir de hongos ofrece ciertas ventajas con respecto a los obtenidos de otras fuentes, ya que este se podría producir a gran escala y de manera controlada durante el tiempo deseado (Velásquez, 2006)[].

Es un hecho conocido que la capacidad de regeneración del sistema nervioso de los humanos es limitada, y como resultado de esto, los pacientes que experimentan lesiones, sufren a menudo la pérdida de la función motora, sensora y/o neuropatías dolorosas. El tratamiento clínico más común para la reparación de un nervio dañado involucra la reconexión quirúrgica directa de los extremos del nervio afectado o el uso de injertos de nervios autólogos; a pesar de lo anterior, los niveles de éxito de estas cirugías no han sido los esperados (Di Mario et al 2008).

Los investigadores han desarrollado nuevas técnicas que involucran la regeneración de dichos tejidos, produciendo de esta manera matrices, soportes o andamios de materiales altamente biocompatibles y biodegradables para ser utilizados como base para el crecimiento celular de los tejidos a tratar. Es por eso, que este trabajo de investigación centra su atención en el desarrollo de andamios a partir de quitosano obtenido experimentalmente del hongo *Aspergillus niger* y de uno comercial de bajo peso molecular suministrado por Sigma–Aldrich.

## PARTE EXPERIMENTAL

**Materiales y reactivos.** Quitosano comercial de bajo peso molecular marca Sigma–Aldrich, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Yeast Peptone Dextrose* YPD, *Papa Dextrosa Agar* PDA, Bactopeptona, ácido trifluoroacético TFA, diclorometano DCM, ácido clorhídrico HCl e hidróxido de sodio NaOH

**Cultivo, crecimiento y escalamiento del hongo *Aspergillus niger*.** La cepa ATCC 16404–*Aspergillus Níger* se obtuvo de los laboratorios de la *American Type Culture Collection*. Se cultivó

en PDA. Para la preparación del medio se utilizaron 7,8 g de PDA para una solución de 200 mL de agua y se procedió a su esterilización, conservando las condiciones de 121°C y 0,1 MPa durante 15 minutos. Una vez logrado el crecimiento y aislamiento fúngico en PDA, así como la determinación de las condiciones óptimas, se procedió a su caracterización macroscópica y microscópica para continuar con el escalamiento, el cual es un proceso en el que se induce un crecimiento rápido, en este caso, se indujo dicho crecimiento al hongo *Aspergillus niger* por medio de un caldo nutritivo (Medio líquido) y por YPD (medio líquido). La finalidad del primer medio era la inducción del crecimiento y multiplicación de esporas, mientras que el segundo medio era para lograr un crecimiento óptimo de hifas en el menor tiempo posible.

**Extracción y desacetilación de la quitina del hongo *A. Niger*.** En esta fase se realizaron diferentes procesos en el hongo para extraer el biopolímero y a su vez llevar a cabo el tratamiento de desacetilación. Se lavaron 85 g de *Aspergillus niger* para eliminar impurezas, y se realizó un tratamiento altamente básico utilizando NaOH al 40% durante 5 horas, a 95°C. Se eliminó todo el exceso de NaOH lavándolo con abundante agua caliente y luego se midió el pH hasta que estuvo cercano a la neutralidad (pH 7). Posteriormente se realizó un tratamiento ácido mezclando el material de forma manual con HCl al 10% durante 3 horas. Se midió el pH, el cual debe oscilar entre 3,8–4,5, luego se centrifugó a una velocidad de 6.000 rpm durante 20–25 minutos a 0°C. La operación de extracción se repitió 3 veces más adicionando HCl al 10%. Los tres extractos se reunieron en un mismo recipiente. Finalmente, el polímero precipitó adicionando NaOH al 40% hasta que el pH fue de 10,0 y posteriormente el sistema se dejó en reposo para una completa sedimentación. El quitosano se recuperó por centrifugación y filtración, posteriormente se lavó con agua, etanol y acetona, y se secó en un horno al vacío a 50°C durante 24 horas, hasta que se obtuvo peso constante.

### **Caracterización del quitosano.**

**Espectroscopia de infrarrojo (FTIR).** El quitosano inicialmente se caracterizó por medio de espectroscopia de infrarrojo (FTIR) con un equipo *Nicolet modelo 8700*, con accesorio para ATR de ZnSe. El número de barridos fueron 100, el intervalo espectral fue de 4.000 a 650  $\text{cm}^{-1}$  y la resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

La Figura 1 muestra los espectros de FTIR del quitosano experimental y comercial. Los resultados arrojaron comportamientos similares, con algunos ruidos debido a residuos de agua en las muestras. El espectro muestra una banda entre 3.400 y 3.200  $\text{cm}^{-1}$  perteneciente al estiramiento

de los enlaces O – H y N – H presentes en la estructura del polímero. La banda entre 2.900 y 2.800  $\text{cm}^{-1}$  se debe al estiramiento de los enlaces C–H. La banda con número de onda 1.600  $\text{cm}^{-1}$  es característica de una amida I, y a 1.590  $\text{cm}^{-1}$  se puede observar la inflexión del grupo –NH<sub>2</sub>. A 1.250  $\text{cm}^{-1}$  se encuentra la vibración de estiramiento C–N y las bandas entre 1.250 y 8.00  $\text{cm}^{-1}$  son estructuras de tipo sacárido del quitosano (Boonsongrit, 2008) [].

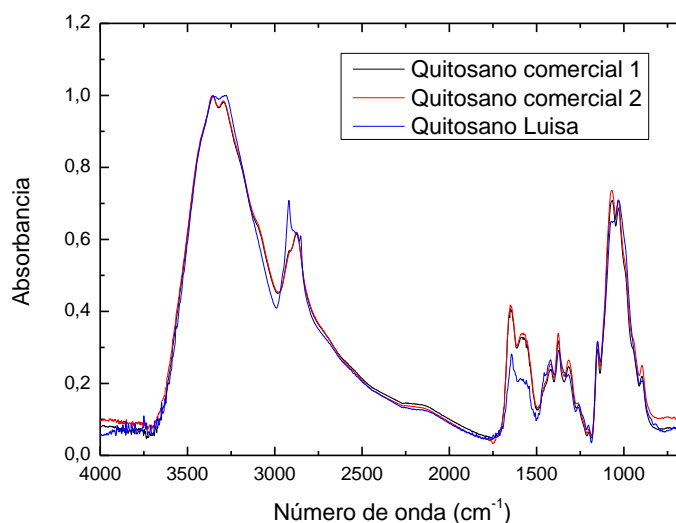


Figura 1. FTIR–Quitosano experimental y comercial.

**Resonancia magnética nuclear (RMN).** El espectro de resonancia magnética nuclear obtenido para el quitosano comercial se muestra en la Figura 2. La asignación de las señales de los diferentes protones presentes en las unidades acetiladas(A) y desacetiladas (D) fue la siguiente: los protones del grupo metilo de la unidad acetilada (d) estuvieron a 2,0 ppm; los protones correspondientes a la unidad desacetilada (a) se situaron cerca de 8,21 ppm; los protones unidos al carbono 2 de la unidad desacetilada (c) estuvieron a 3,15 ppm. Los picos situados entre 3,6 y 4,8 ppm se atribuyeron a los protones de los carbonos 2 al 6 de las unidades acetiladas, y del 3 al 6 de las desacetiladas (b) (Hirai et al 1991).

El espectro obtenido para el quitosano experimental se muestra en la Figura 3. Los protones del grupo metilo de la unidad acetilada (d) estuvieron a 1,9 ppm; el protón correspondiente a la unidad desacetilada (a) se situó cerca de 8,15 ppm; el protón unido al carbono 2 de la unidad desacetilada (c) estuvo a 3,10 ppm. Los picos situados entre 3,5 y 5,0 ppm se atribuyeron a los protones de los carbonos, 2 al 6 de las unidades acetiladas, y del 3 al 6 de las desacetiladas (b). (Hirai et al 1991).

Se puede observar en la Figura 4 que, aunque los picos del quitosano experimental son muy parecidos a los del quitosano comercial, se aprecian unos ruidos que pueden indicar la presencia de impurezas que no se eliminaron completamente en el proceso de hidrolisis básica.

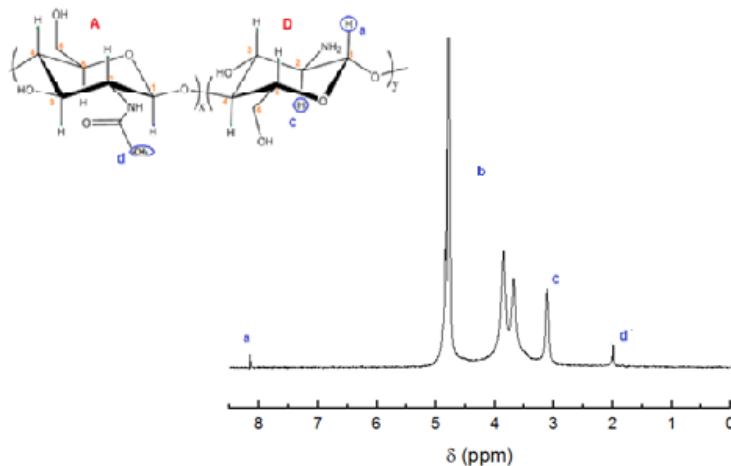


Figura 2. RMN del quitosano comercial.

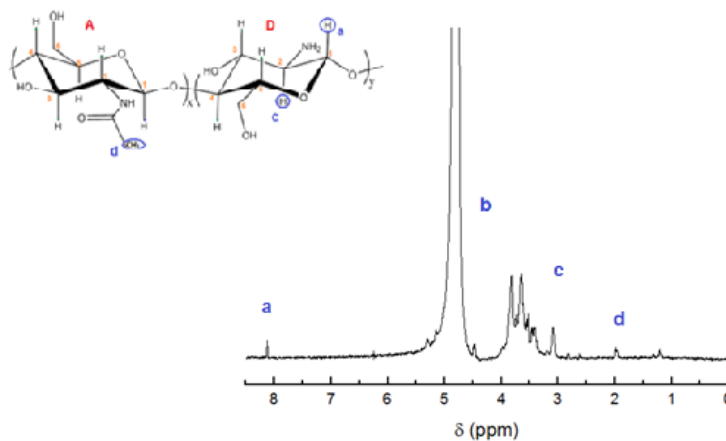


Figura 3. RMN del quitosano experimental.

**Grado de desacetilación.** A partir de los resultados de las medidas de resonancia magnética nuclear y de la ecuación (1) (Hirai, 1991), se obtuvo el grado de desacetilación para las muestras de quitosano experimental y comercial, mostrándose en la Tabla 1 los porcentajes para cada uno. El grado de desacetilación para ambos quitosanos es similar al reportado por Hirai et al, Diaz y González et al, quienes obtuvieron grados de desacetilación (DD) de 97, 90, y 90,5%, respectivamente. También se encontraron investigaciones como la de Grande et al y (Beltran,

2010) quienes obtuvieron DD por debajo de los obtenidos en este trabajo.

$$DD(\%) = \left\{ 1 - \left( \frac{\frac{1}{3}ICH_3}{\frac{1}{6}(IH_2 - H_6)} \right) \right\} \times 100 \quad (1)$$

donde ICH<sub>3</sub> es la Intensidad de la señal de CH<sub>3</sub> e IH la suma de las intensidades de los picos correspondientes a los hidrógenos.

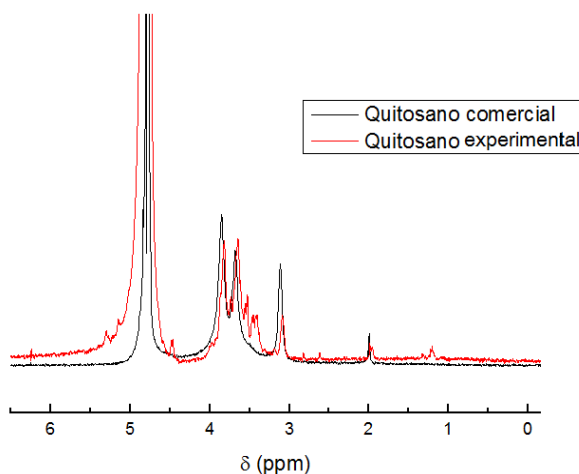


Figura 4. Comparación de resultados de quitosano experimental y comercial.

Es importante resaltar que el grado de desacetilación está directamente relacionado con la solubilidad, por lo que un DD de desacetilación tan alto como los obtenidos en esta investigación, podría generar inconvenientes en el momento en el que se desee solubilizarlo (Gartner, 2013).

Tabla 1. Grado de desacetilación (DD) – quitosano experimental y comercial.

Grado de desacetilación (DD%)	
Quitosano experimental	93,5
Quitosano comercial	92,5

**Análisis termogravimétrico (TGA/DTGA).** La Figura 5 muestra las curvas de pérdida de masa (TGA) para el quitosano comercial y experimental.

En el quitosano comercial, en la primera etapa del proceso de degradación que va de 0 a

300°C hay una pérdida de masa de aproximadamente 9%, lo cual se debe a la evaporación de agua. La segunda etapa y más predominante ocurre a 317°C, en la que se observa una pérdida de masa de aproximadamente 40% en esta etapa se llevan a cabo reacciones de depolimerización de las cadenas del quitosano, descomposición de los anillos de piranosa a través de reacciones de deshidratación y desaminación, y reacciones de apertura de anillo. (Zizumbo, 2013).

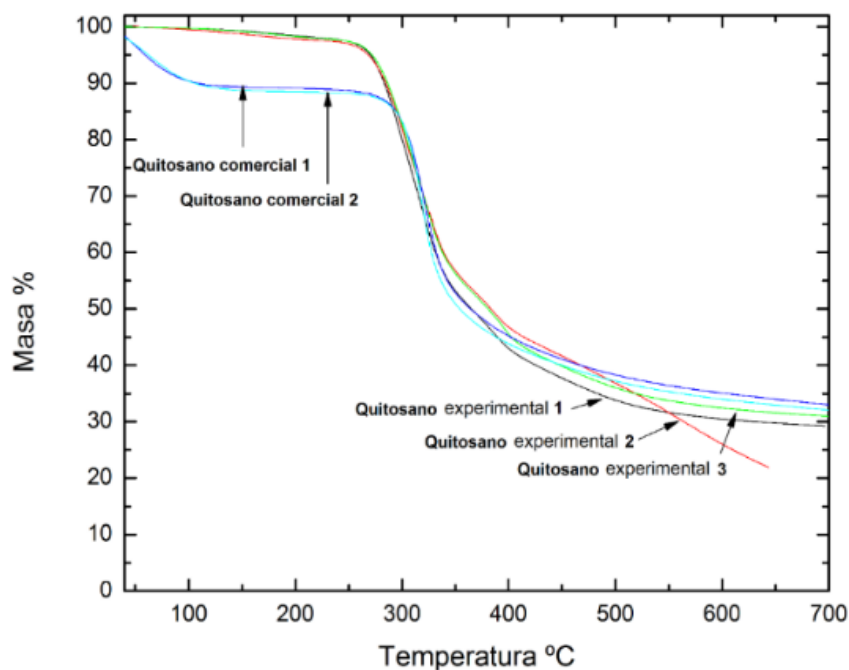


Figura 5. TGA de muestras de quitosano experimental y comercial.

En el quitosano experimental, se aprecia una pérdida de masa aproximada al 50% a 292°C, En la Figura 6 se muestra la primera derivada de la pérdida de masa (DTGA) en donde se pueden observar dos caídas para el quitosano comercial, la primera está ubicada aproximadamente a 60°C y la segunda a 317°C con un porcentaje de masa residual a 700°C de aproximadamente de 30%. En el quitosano comercial se observa una caída a 292°C y otra a 393,7°C, con un porcentaje de masa residual a 650°C de aproximadamente el 23%.

**Conformado del material por mediante electrohilado.** En la Tabla 2 se muestran los diferentes parámetros a los que fueron conformadas las películas, se trabajó inicialmente con una concentración de 6% de quitosano, pero al no obtener fibras con esta concentración, finalmente se trabajó con una concentración de quitosano al 7%, un potencial eléctrico de 30 kV, flujo de 0.5 mL·h<sup>-1</sup> y una distancia de la aguja al colector 13 cm y el tiempo de conformado se varió entre 20 y

120 minutos.

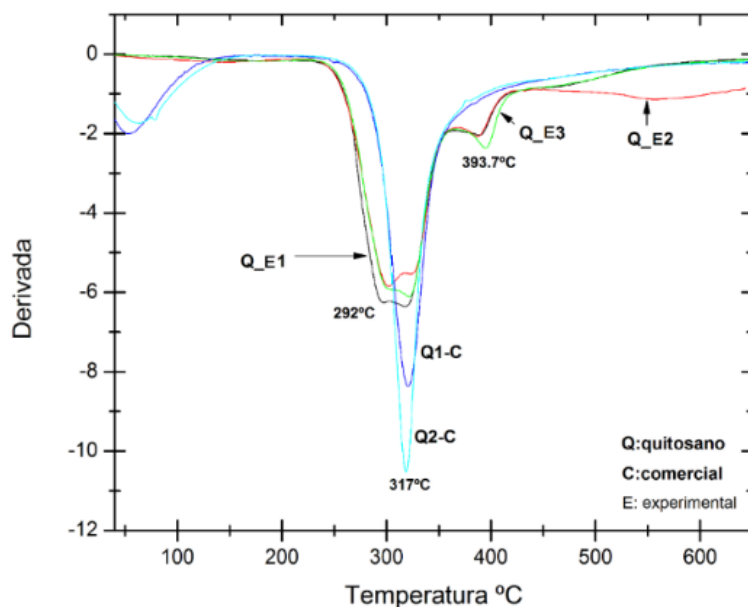


Figura 6. DTGA de muestras de quitosano experimental y comercial.

Se pueden observar las imágenes de las 5 películas conformadas a los diferentes parámetros, logrando ver el cambio en la distribución de las fibras en el recolector a medida que el tiempo de conformado aumentaba. En las primeras tres películas (Figuras 7, 8, y 9) se observa el depósito del polímero concentrado aproximadamente en el centro del recolector, mientras que en las 2 restantes (Figuras 10 y 11) se aprecia el depósito del polímero mejor distribuido a lo largo de todo el recolector.

Tabla 2. Parámetros de conformado de quitosano comercial.

Película	Concentración	Potencial eléctrico kv	Flujo mL /h	Distancia del colector cm	Tiempo min	Porcentaje de humedad	Estado de conformado
1-6	6%	25	1	15	no aplica	42	no fibró
2-6	6%	27	0,9	15	no aplica	34-33	no fibró
3-6	6%	30	0,7	15	no aplica	32	no fibró
4-6	6%	30	0,5	15	no aplica	32	no fibró
5-6	6%	30	0,5	13	no aplica	31	no fibró
1-7	7%	30	0,5	13	20	43-33	fibró
2-7	7%	30	0,5	13	30	32	fibró
3-7	7%	30	0,5	13	45	31	fibró
4-7	7%	30	0,5	13	60	32	fibró
5-7	7%	30	0,5	13	120	31	fibró





Figura 7. Película 1 conformada a 20 minutos con quitosano comercial.



Figura 8. Película 2 conformada a 30 minutos con quitosano comercial.



Figura 9. Película 3 conformada a 45 minutos con quitosano comercial.

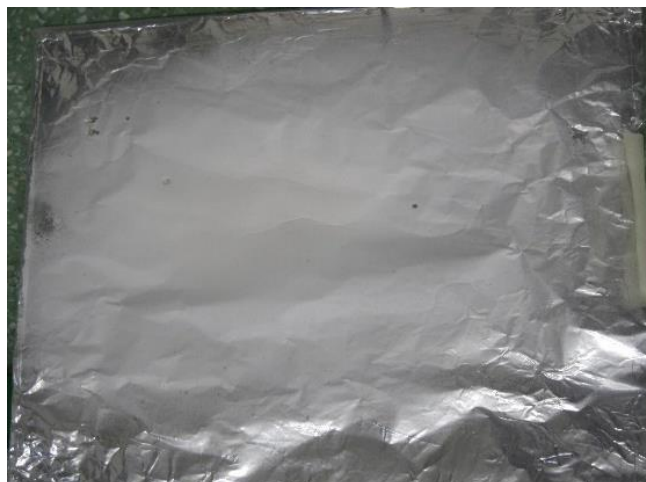


Figura 10. Película 4 conformada a 60 minutos con quitosano comercial.



Figura 11. Película 5 conformada a 120 minutos con quitosano comercial.

### **Caracterización de las películas**

**Ensayo de tensión.** El ensayo de tensión se logró realizar exitosamente en 4 de las películas de quitosano comercial (Ver Figuras 8, 9, 10, y 11). La película 1 (Ver Figura 11) conformada en un menor tiempo, presentó problemas en la preparación de la muestra, debido a su poca uniformidad y separación entre fibras.

De acuerdo con la Tabla 4 la película que muestra mejores propiedades mecánicas es la 5.7, la cual tuvo un mayor tiempo de conformado. Tanto la resistencia a la tensión como el modulo a la

tensión, aumentan proporcionalmente en función del tiempo. La resistencia a la tensión de todas las películas es considerablemente más alta comparada con otros autores, tales como **Mohammad et al** 2012 [] y **Alizadeh et al.** 2013 [] con valores de 220 y 130 kPa, respectivamente.

Tabla 4. Resultados ensayo de tensión.

<i>Película</i>	<i>Resistencia a tensión</i> <i>MPa</i>	<i>Módulo a tensión</i> <i>MPa</i>
1.7	no aplica	no aplica
2.7	0.92	10.18
3.7	1.21	11.19
4.7	1.41	23.97
5.7	2.14	27.70

**Microscopía electrónica de barrido (SEM).** Las imágenes SEM de las películas obtenidas durante el proceso de electrohilado a partir de las condiciones consideradas como óptimas para las soluciones de quitosano comercial se muestran en la Figura 7. Las imágenes SEM que se obtuvieron, nos muestran cómo a medida que el tiempo de conformado aumenta, igual lo hace la distribución de diámetros y la homogeneidad en las fibras, siendo más evidente en la Figura 5.15. Las películas 1.7, 2.7 y 3.7 muestran diámetros de fibra no uniformes, con diámetros desde 0,25 hasta 3,38  $\mu\text{m}$ , la película 4.7 muestra diámetros de fibra un poco más uniformes desde 0,21 hasta 1,28  $\mu\text{m}$ , mientras que la película 5.7 conformada a 120 minutos muestra una distribución de diámetros mucho más estrecha desde 0,25 hasta 0,89  $\mu\text{m}$ .

En las imágenes de SEM se evidencia una alta porosidad de todas las películas conformadas, lo cual de acuerdo con (**Corona**, 2013) favorece la aplicación de estas como andamios en ingeniería de tejidos, ya que dentro de estos poros es donde se genera el crecimiento celular. La formación uniforme de poros así como el tamaño son importantes en la formación de un andamio debido a que éste ayuda, principalmente, a la retención y adhesión de las células en el andamio y, por lo tanto, a la formación del neot Tejido (**Corona**, 2013).

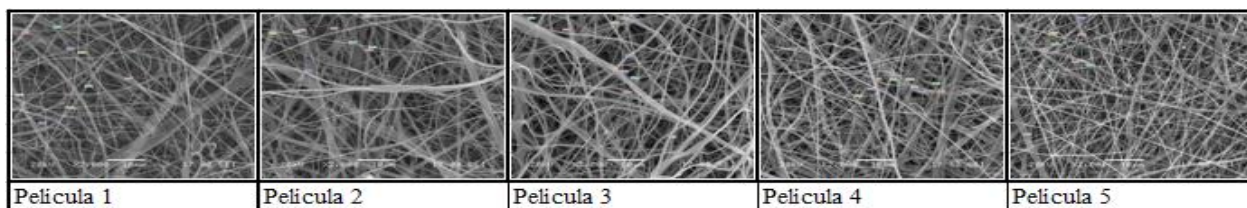


Figura 12. SEM de una muestra de quitosano comercial.

En los resultados obtenidos por medio del espectrómetro de energía dispersa EDX (Ver Tabla 5) se puede observar que tanto el quitosano comercial como el experimental tienen porcentajes muy similares para cada uno de los elementos evaluados, notándose una pequeña diferencia en la cantidad de oxígeno.

Tabla 5. Resultados SEM/EDX.

QUITOSANO EXPERIMENTAL					
Muestra 1			Muestra 2		
Elemento	peso%	Atómico%	Elemento	peso%	Atómico%
C K	43,44	50,27	C K	44,64	51,41
N K	4,70	4,67	N K	5,77	5,70
O K	51,86	45,06	O K	49,59	42,89

QUITOSANO COMERCIAL					
Muestra 1			Muestra 2		
Elemento	peso%	Atómico%	Elemento	peso%	Atómico%
C K	45,82	52,34	C K	46,13	52,48
N K	9,93	9,73	N K	12,32	12,02
O K	44,24	37,94	O K	41,56	35,50

### CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos durante el desarrollo experimental de este trabajo, se han podido llegar a las siguientes conclusiones:

Es posible llevar a cabo el cultivo, crecimiento y escalamiento del hongo *Aspergillus niger* para ser utilizado como reemplazo o complemento de fuentes alternas de quitosano.

Se extrajo y desacetiló la quitina contenida en las paredes celulares de las hifas del hongo *Aspergillus niger*, por medio de tratamientos básicos y ácidos, obteniendo un grado de desacetilación máximo (DD) de 95% y un rendimiento del 8,5%.

De acuerdo a los análisis químicos y térmicos, el quitosano comercial y el obtenido experimentalmente del hongo *Aspergillus niger*, poseen propiedades y características muy similares.

Se obtuvo películas de quitosano comercial porosas conformadas por electrohilado, con fibras de diámetro aproximado de 0,74  $\mu\text{m}$  (para la película conformada a 120 minutos), con una resistencia máxima a la tensión de 2,14 MPa y un módulo de tensión de 27,70 MPa, lo que

potencializa su aplicación en andamios para crecimiento tisular.

No se logró realizar el conformado del quitosano experimental en andamios por medio del proceso de electrohilado, debido a las capacidades máximas de los equipos utilizados.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Alizadeh M, Abbasi F, Khoshfetrat A, Ghaleh H “Microstructure and characteristic properties of gelatin/chitosan scaffold prepared by a combined freeze–drying/leaching method”, *Materiales Science and Engineering* **33**, 3958 (2013)
- [2] Beltran J “*Extracción y caracterización de quitosano del camarón titi y su aplicación en la liberación controlada de un fármaco*”. Cali, Colombia, 2010
- [3] Boonsongrit Y, Mueller B, Mitrevej A, Characterization of drug–chitosan interaction by <sup>1</sup>H NMR, FTIR and isothermal titration calorimetry, *European of pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **69(1)**, 388 (2008)
- [4] Chavez A, Colina M, Valbuena A, López A, Obtención y caracterización de papel de quitosano, *Revista Iberoamericana de polimeros*, **13(2)**, 41 (2012)
- [5] Corona I “*Síntesis y caracterización fisicoquímica de un andamio celular a base de quitosano biológico–químico y colágena tipo I*”. Mexico D.F., Mexico, 2013
- [6] Di Mario F, Rapana P, Tomati U, Galli E “Chitin and chitosan from basidiomycetes”, *International J. Biological Macromolecules*, **43(1)**, 8 (2008)
- [7] Diaz R “*Aplicación de una cobertura de quitosano en la conservación de tomates*”. Habana, Cuba, 2003
- [8] Gartner C “*Preparación de soportes de quitosano–gelatina para su aplicación en ingeniería de tejidos*”. Medellín, Colombia, 2013
- [9] Gonzalez D, Cruz A, Martinez B, Ramirez M, Rodriguez A “*Antifungal Activity in vitro of Chitosan Sigma on Patogen Fungi that Cause Spotted Grain in Rice (Oryza sativa L.)*”. Ciudad de la Habana, Cuba. 2009
- [10] Grande C, Extracción, identificación y caracterización de quitosano del micelio de aspergillus niger y sus aplicaciones como material bioadsorbente en el tratamiento de aguas, *Revista Iberoamericana de Polimeros*, **11(5)**, 296 (2010)
- [11] Hernández I “*La quitosana: un producto bioactivo de diversas aplicaciones*”. La Habana: Cultivos Tropicales, Cuba, 2004
- [12] Hirai A, Odani H, Nakajima A, Determination of degree of deacetylation of chitosan by H–NMR spectroscopy, *Polymer Bulletin*, **26**, 87 (1991)
- [13] Mohammad Z, Bou–Akl T, Walters III H, Matthew H, Improving the mechanical properties of chitosan–based heart valve scaffolds using chitosan fibers, *J. mechanical behavior of biomedical materials*, **5(1)**, 171 (2012)
- [14] Shirai K “*Quitosano*”. Unidad Iztapalapa. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, 2011
- [15] Velásquez C “*Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro*”. Merida, Venezuela, 2006
- [16] Zizumbo F “*Obtención y caracterización de andamios en forma de conductos tubulares coaxiales a base de quitosano y poli(ácido láctico) mediante la técnica de electrohilado para su posible uso en la regeneración de nervios periféricos*”, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México, 2013