

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES MORFOLÓGICAS Y REOLÓGICAS DE UNA RED HÍBRIDA DE POLÍMERO SINTETIZADA A PARTIR DE TRES BIOPOLÍMEROS: GELATINA/QUITOSAN/DEXTRAN

Ricardo García Chávez^{1,2*}, Ana María Mendoza Martínez¹

- 1) Instituto Tecnológico de Ciudad Madero, División de Estudios de Posgrado e Investigación (ITCM). Juventino Rosas y Jesús Urueta, Col. Los Mangos, Ciudad Madero, Tam., México, C.P. 89440, Tel/Fax. (833) 2 15 85 44. Correo electrónico: ricardo.garcia.chavez@gmail.com
- 2) Instituto Mexicano del Petróleo, Eje Central Lázaro Cárdenas Norte 152, San Bartolo Atepehuacan, Gustavo A. Madero, México, Distrito Federal. C.P. 07730

Recibido: Junio de 2009; Aceptado: Enero de 2010

RESUMEN

En este trabajo se preparó una red híbrida de polímeros (HPN) mediante síntesis simultánea a partir de tres biopolímeros: dextrano, quitosano y gelatina, disueltos en una solución de ácido acético. Estos fueron entrecruzados en presencia de glutaraldehído y posteriormente secados a -10 y 30°C. Estos biopolímeros por separado, son biodegradables y no-tóxicos, por lo que han sido estudiados ampliamente para su uso en medicina. Estas características le permiten ser utilizados como soportes para el crecimiento de tejido conectivo sobre áreas gravemente dañadas por quemaduras en los humanos, así también, en algunos materiales como en el caso de liberadores graduales de fármacos por atrapamiento físico de antibióticos en la matriz polimérica. Se obtuvieron materiales biopoliméricos a diferentes concentraciones de agente entrecruzante y método de secado (liofilización y horno de vacío), los cuales fueron caracterizadas mediante FTIR, SEM y DSC para evaluar sus propiedades morfológicas, térmicas, así como, su capacidad de absorción de agua.

Palabras Claves: Red híbrida de polímeros, quitosano, gelatina, dextrano.

ABSTRACT

In this work a Hybrid Polymer Network (HPN) was prepared by simultaneous synthesis of three biopolymers: dextran, chitosan and gelatin dissolved in acetic acid solution, they were crosslinked in presence of glutaraldehyde being dried at -10 and 30°C. These biopolymers separately are biodegradable and non toxic that they have been widely used for medical purposes. These characteristics let to be used both as supports for connective tissue growing over areas severely damaged by burns in humans and in some materials as in the case of gradually drug release by physical trapping of antibiotics into the polymer matrix. Biopolymer materials were obtained at different concentrations of crosslinked concentrations and dryness method (freeze dry and vacuum oven) and were characterized by FTIR, SEM and DSC techniques and rheological studies in order to evaluate their morphological, thermal and rheological properties in addition to their capacity to absorb water.

Key words: Hybrid polymer network, Chitosan, Gelatin, Dextran.

INTRODUCCION

Mientras que los usos originales de los polímeros en cirugía eran centrados primariamente en reposición de tejido conectivo, una multitud de nuevas aplicaciones han emergido como resultado de amplios avances en las ciencias de biología molecular y biología desarrollada. El desarrollo de nuevas proteínas y drogas basadas en ácidos nucleicos los cuales no pueden ser tomados en la forma clásica de píldoras, proveen un nuevo impulso para el desarrollo de polímeros implantables que

sirven como controladores y liberadores de drogas, así como las aplicaciones en campos relativamente nuevos como la ingeniería de tejidos, donde los polímeros son usados para asistir en la regeneración de tejidos tridimensionales y estructuras de órganos.

Las redes interpenetradas de polímeros (IPN's) están constituidas por dos o más redes de polímeros entrecruzados distintos, estas redes están unidas permanentes con solamente enlaces covalentes accidentales entre los polímeros [1] o solamente por entrecruzamiento físico. Los IPN's se caracterizan por sus propiedades de hinchamiento (conocido como hidrogel o gel), morfología y resistencia a la compresión basadas en su composición y condiciones de síntesis. *Peppas y col.* [9] define los hidrogeles como una red macromolecular hinchada en agua o en un fluido biológico.

Los hidrogeles basados en quitosano entrecruzado covalentemente pueden dividirse en tres tipos, quitosano entrecruzado consigo mismo, red híbrida de polímeros (HPN) y semi IPN o IPN completa (véase las Figuras 1-3) [2].

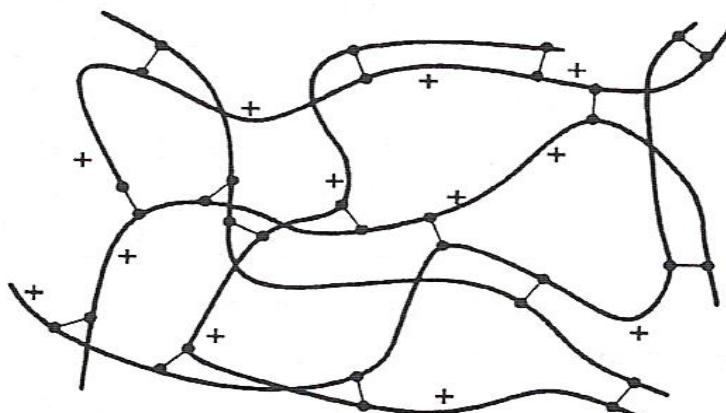


Figura 1. Quitosano entrecruzado consigo mismo. Fuente: *Berger et al.*, 2004.

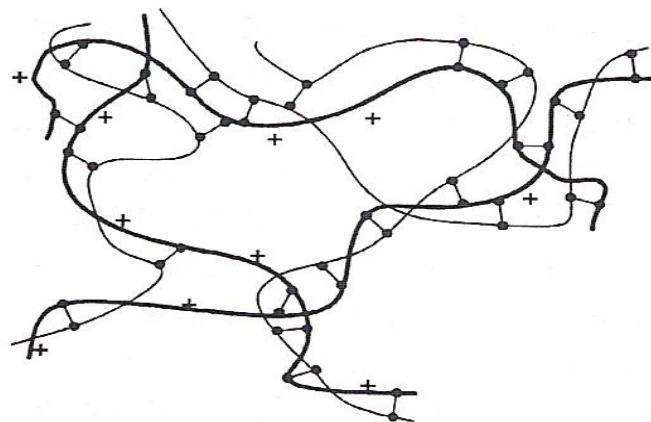


Figura 2. Red híbrida de polímeros (HPN). Fuente: *Berger et al.*, 2004.

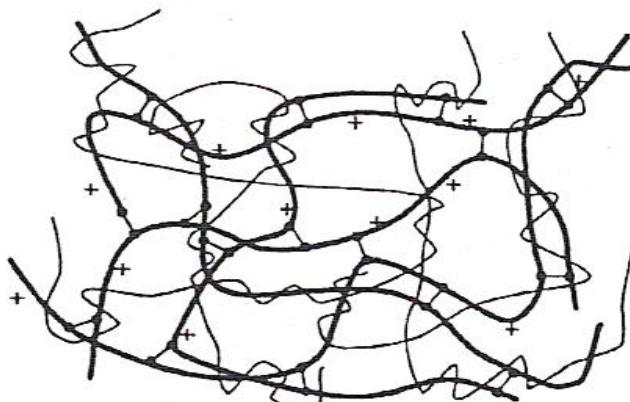


Figura 3. Semi IPN o IPN completa. Fuente: Berger *et al.*, 2004.

Berger [2] explica que las cadenas poliméricas forman una red conteniendo muchos poros llenados con pequeñas moléculas como el agua, que puede estar libre o enlazada a grupos hidrófilos de la red. Algunos sistemas ligeramente entrecruzados forman hidrogeles superabsorbentes en los cuales el entrecruzado da como resultado un incremento del agua libre en el medio continuo. Con un incremento en la densidad de entrecruzado, el contenido de agua, la capacidad de hinchamiento y el tamaño de poro en la red decrece, ciertamente, al incrementar la magnitud del entrecruzado, decrece la habilidad de el quitosano para formar enlaces de hidrógeno con las moléculas del agua.

Como anteriormente se mencionó, el término *biomateriales* ha sido usado alternativamente para describir materiales derivados de fuentes biológicas, o para describir materiales usados para terapias en el cuerpo humano [3].

Hoy en día la mayoría de los polímeros son materiales sintéticos, su biocompatibilidad y su biodegradabilidad son mucho más limitadas que en los polímeros naturales como la celulosa, quitina, quitosano, gelatina, dextrano, etc., estos polímeros naturales tienen excelentes propiedades tales como la biocompatibilidad, biodegradabilidad, no-toxicidad, propiedades de adsorción, que individualmente han sido ya estudiados e utilizados en la síntesis de materiales con propiedades superabsorbentes, como soportes para tejido interconectivo (piel) y como liberadores graduales de drogas.

El quitosano es el producto obtenido de la desacetilación del biopolímero natural quitina, ambos biopolímeros son químicamente similares a la celulosa, diferenciándose solamente en los grupos funcionales situados en el carbón-2 de la unidad monomérica (véase la Figura 4). La presencia de grupos amino libres en el quitosano aumenta grandemente la solubilidad y reactividad

de este polímero tanto en la quitina como en la celulosa. El quitosano es aceptado universalmente como un derivado N-desacetilado y no-tóxico de la quitina, donde la quitina es n-desacetylada a tal grado, que éste empieza a solubilizarse en soluciones acuosas de ácido acético y fórmico [1, 8].

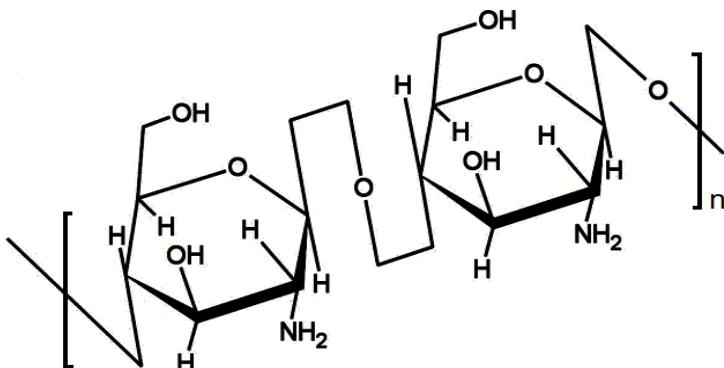


Figura 4. Estructura del quitosano.

Navarro y Mansan [6] estudiaron el mecanismo de interacción del glutaraldehído con microorganismos; ellos concluyeron que en un suceso normal de la reacción del glutaraldehído con grupos amina, un enlace imino es inmediatamente formado. Este enlace es estabilizado por resonancia con el adyacente doble enlace etilénico.

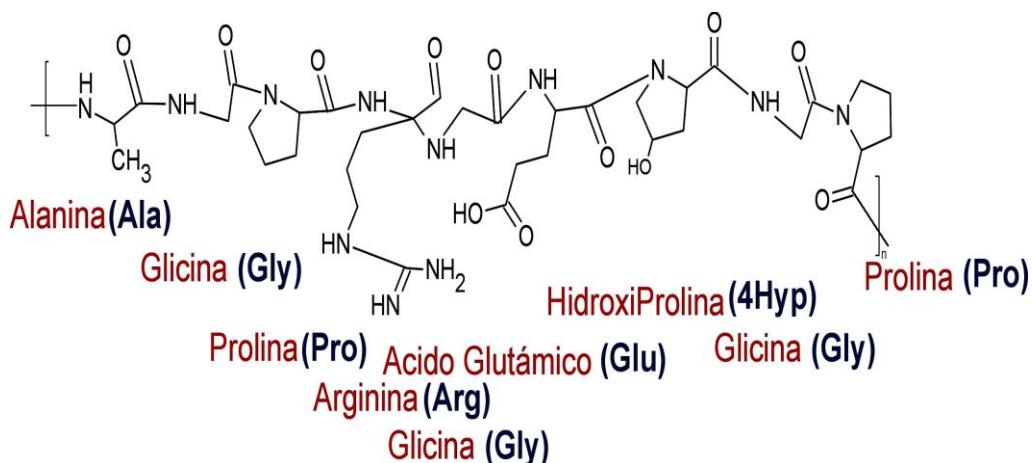


Figura 5. Estructura de la gelatina.

La gelatina es un bioproducto animal derivado de la hidrólisis parcial del colágeno seguido por la extracción agua. La gelatina contiene un gran número de aminoácidos tales como la alanina, glicina, prolina, 4-hidroxiprolina, etc. Una estructura típica de la gelatina es -Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro- (ver Figura 5). La gelatina puede ser fácilmente entrecruzada, además de ser biodegradable. El entrecruzamiento puede llevarse a cabo por medio de varias técnicas químicas, incluyendo glutaraldehído, carbodiimida, isocianatos, entre otros químicos. Generalmente, la

distribución de peso molecular de la gelatina es de 15.000 a 250.000 g/mol. La gelatina es soluble en agua, ácido acético y en la mayoría de los disolventes orgánicos. La gelatina es extensamente usada en la industria de la comida, farmacéutica y fotográfica y puede ser usada en fibras con la incorporación de plastificantes [4].

Los dextrans son una familia de polímeros neutrales, solubles e insolubles al agua, conteniendo un α -1,6-D-glucopiranósil en su cadena principal, (ver Figura 6). Los dextrans son de pesos moleculares altos, polidispersos y sin carga. Los dextrans son derivados de la fermentación enzimática de la sucrosa por el *Leuconostoc mesenteroides* y otros microorganismos los que lo producen como polisacáridos extracelulares. Estos también son formados por otros métodos enzimáticos con dextrano sucroso. El dextrano de *Leuconostoc mesenteroides* contiene un 95% de conexiones en su estructura en 1,6 y 5% distribuidos al azar en 1,3. La mayoría de sus ramificaciones contienen una o dos unidades de glucosa. El dextrano fue el primer polímero microbial extracelular usado industrialmente, primariamente como entendedor de plasma y en tecnología de separación. El dextrano exhibe baja viscosidad, ha sido derivatizado, formando complejos con iones metálicos, y son compatibles con sales, ácidos, bases, en un amplio intervalo de temperaturas. Los geles de dextrano entrecruzado son usados en aplicaciones de cromatografía y separación [4].

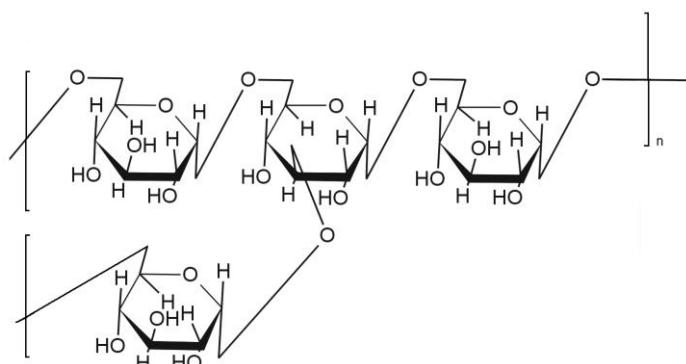


Figura 6. Estructura molecular del dextrano.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. MATERIALES

2.1.1. Especificaciones de los materiales utilizados. Quitosano de alto peso molecular, grado de desacetilación 75-85%, dextrano grado industrial de *Leuconostoc Mesenteroides*, con un peso molecular promedio de 5.000.000-40.000.000 g/mol, ácido acético glacial 99,99% de pureza como disolvente, glutaraldehído (GL) en solución acuosa al 50% en peso, así como, MgCl₂ como compatibilizante, todos estos productos son de la marca *Aldrich*. Gelatina de

piel de cerdo, 300 Bloom de Sigma, todos estos reactivos fueron usados como se recibieron sin haber sido purificados.

2.2. MÉTODOS.

2.2.1. Métodos de preparación. Se evaluaron dos métodos de preparación, los cuales se diferenciaban en el modo en que el disolvente se eliminaba de la mezcla, éstos se describen brevemente a continuación:

a) Secado en horno de vacío. El método que se usó para la preparación de los materiales poliméricos de quitosano, gelatina, dextrano fue propuesto por Oyrton [7] y es el siguiente:

1. Se mezclaron gelatina (70%), quitosano (20%) y dextrano (10%) junto con MgCl₂ en una solución acuosa de ácido acético al 2% en peso. Se agitó durante unas 2 horas a una temperatura constante de 35±2°C.
2. Despues se colocaron en un baño de ultrasonido para la eliminación de burbujas creadas durante la agitación.
3. Durante una nueva agitación se agregó, gota a gota, una solución acuosa del glutaraldehído a la mezcla (solución de GL al 0,25, 0,5 y 1,0% en peso).
4. Esta mezcla se vació en un recipiente de poliestireno.
5. Se puso la solución a secar dentro de una estufa de vacío a una temperatura constante de 30±2°C.
6. A la película formada del material polimérico se le hicieron lavados con una solución acuosa de NaOH al 20% en peso, para neutralizar residuos del agente entrecruzante sin reaccionar.
7. Se puso a secar nuevamente en la estufa.
8. Se obtuvo una película de material polimérico.

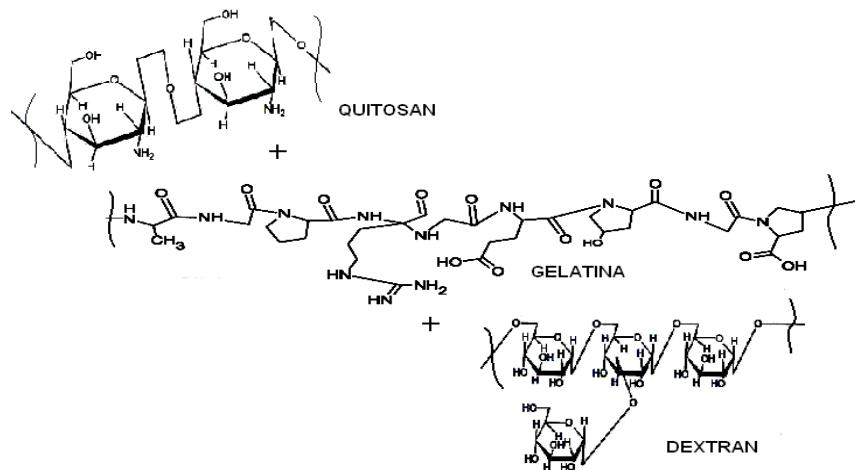


Figura 7. Componentes de la mezcla de biopolímeros disueltos en la solución acuosa de ácido acético.

b) Secado por liofilización. El procedimiento de preparación de la muestra es el descrito anteriormente, sin embargo, el método de secado aplicado fue por medio de liofilización, secando a

una temperatura de -10°C hasta formar la película, finalmente las películas formadas fueron puestas en un desecador (véanse las Figuras de la 8 a la 9) [5].



Figura 8. Material obtenido después del entrecruzamiento de la mezcla de gelatina, quitosano y dextrano, por medio del glutaraldehído y secado a -10°C por liofilización.



Figura 9. Material obtenido después del entrecruzamiento de la mezcla de gelatina, quitosano y dextrano, por medio del glutaraldehído y secado a 30°C en horno de vacío.

2.3. Caracterización de los biomateriales obtenidos.

2.3.1. Identificación de los grupos funcionales característicos mediante análisis infrarrojo (FTIR).

El equipo utilizado para la determinación de este análisis fue un FTIR marca *Perkin Elmer, Spectrum One*, con un estereomicroscopio *AutoIMAGE*. La muestra se analizó por medio de una pastilla preparada con 200 mg de KBr y 20 mg de muestra del material polimérico, la muestra fue bien incorporada al KBr triturando bien la mezcla en un mortero de ágata.

2.3.4. Determinación de la temperatura de transición vítrea (T_g) mediante calorimetría

diferencial de barrido (DSC). Para llevar a cabo este análisis se empleó un DSC *TA Instruments* modelo 2010 con una velocidad de calentamiento de 10 grados/min y con atmósfera de nitrógeno, se le dieron dos barridos a las muestras, el primero en el intervalo de -50 a 40°C para eliminar el historial térmico utilizando de 8 a 10 mg de muestra depositada en una cápsula de aluminio y el

segundo en un intervalo de -50 a 40°C. El equipo fue calibrado con estándares de indio y cinc.

2.3.3. Observación de la morfología de los materiales por medio del microscopio electrónico de barrido (SEM). Las muestras fueron observadas por medio de un microscopio electrónico de barrido ambiental, *Phillips XL30 ESEM*, fueron cortadas introduciéndolas en N₂ líquido y al sacarlas se fracturaron, para después ser sumergidas en agua por 24 horas, después de esto se sacaron y se observó la zona transversal y superficial a un voltaje de 25 kV, con una presión de vapor de agua de 3,8 torr en la zona de la muestra y aumentos aplicados de 250, 500 y 1.000 veces.

2.3.4. Determinación del porcentaje de absorción de agua. El porcentaje de absorción de agua de las muestras fue determinado mediante el hinchamiento de éstas en soluciones tampón con pHs de 2, 4 y 7, a una temperatura controlada de 25±°C, observándose su comportamiento durante 4 días (96 horas). De la siguiente manera:

1. Las muestras a hinchar son previamente secadas en vacío por medio de liofilización para asegurarse de que no contengan humedad extraída del medio ambiente circundante y puestas en un desecador a temperatura ambiente.

2. Se cortan segmentos de muestra que pesen aproximadamente 1 g y procurando una forma rectangular de modo que quepan por la boca de un vial de 25 mL previamente pesado (vial).

3. En el vial pesado previamente se agregan 16 mL de solución tampón, en este caso se determinó el hinchamiento para con soluciones de un pH de 2, 4 y 7.

4. Dentro del vial con los 16 mL de solución tampón (2,4 ó 7 según sea el caso) se introduce el segmento de muestra a hinchar, se cierra el vial y se pone en un baño de temperatura controlada a 25±1°C.

5. A las dos horas de haber estado expuesta la muestra en el medio acuoso se saca del baño de temperatura controlada y se le retira la solución tampón cuidadosamente dejándose únicamente la muestra hinchada dentro del vial, cuidadosamente con papel filtro u otro material absorbente disponible que no deje trazas del mismo, se retira el excedente de solución tampón sobre la superficie del material hinchado y sobre las paredes del vial.

6. Se pesa el vial y la muestra hinchada juntos después de quitar el excedente de la solución tampón, y se registra el peso del material hinchado deducido al restarle el peso del vial en seco pesado al inicio del experimento.

7. Se le agregan 16 mL nuevamente de la misma solución tampón y se vuelve a colocar dentro del baño de temperatura controlada. Las posteriores mediciones se realizaron a las 24, 48, 72 y 96 horas realizando el mismo procedimiento anterior.

Mediante la siguiente formula se determinó el porcentaje de absorción de agua:

$$W_{sw} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \cdot 100 \quad (2.1)$$

donde W_t representa el peso de la muestra con adsorción de agua después de determinado tiempo (2, 24, 48, 72 y 96 horas), W_0 el peso del material seco y W_{sw} es el porcentaje de absorción de agua [5].

2.3.5. Pruebas reológicas. Para caracterizar reológicamente las muestras se utilizó un reómetro rotacional CSL² 500 marca TA Instruments a una temperatura constante de 20°C utilizando un plato de acero de 2 cm y una fuerza aplicada de 500 dinas/cm² donde se determinó G', G'', G*, h', h'', h*, d y tan δ. Las muestras se prepararon pulverizando el material seco en N₂ líquido dentro de un mortero de porcelana, después de esto 5 g de muestra triturada fueron hinchados dentro de un vial de vidrio, donde se les agregó 10 mL de una solución tampón de pH 7.

La muestra hinchada se homogenizó calentando los viales a temperatura constante de 40°C por 12 horas en un baño de temperatura controlada, una vez pasadas las 12 horas se vació el contenido de los viales en cápsulas de polipropileno de 5 cm de diámetro, dejándose enfriar a temperatura ambiente, para posteriormente cortar las muestras a analizar en círculos de 1 cm de diámetro.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Identificación de los grupos funcionales característicos mediante análisis infrarrojo (FTIR).

Los materiales obtenidos a partir de gelatina/quitosano/dextrano a -10 y 30°C, se analizaron por medio de espectroscopia de infrarrojo (FTIR), donde se identificaron los grupos funcionales característicos de los dos biopolímeros al entrecruzarse, tales como los picos a 1.552 cm⁻¹ (CH₂-NH₂) y 1.668 cm⁻¹ al cual se le atribuyen características imino C=N, formado por las reacciones de entrecruzamiento de los grupos aldehídos del glutaraldehído con los grupos amino de gelatina y quitosano (véanse las Figuras 10 y 11). La presencia de estos grupos confirma que la red sintetizada se formó vía -C=N-, se puede observar también, que las bandas características del dextrano ubicadas en la longitud de onda de 1.013 y 1.395 cm⁻¹ relacionadas con grupos funcionales CH₂-OH presentan un decremento en su magnitud debido a su consumo al reaccionar los grupos OH del dextrano con los grupos aldehídos. Es importante notar en los espectros que el dextrano sigue reaccionando durante el proceso de secado en las muestras secadas por medio de horno de vacío a 30°C observándose el consumo de estos grupos OH en el espectro debido a la reacción de entrecruzamiento. Por otro lado, no hay evidencia de grupos aldehídos en el espectro lo cual

comúnmente se presentaría como un pico fuerte en la longitud de onda de 1.720 cm⁻¹, el cual señalaría la presencia de grupos aldehídos remanentes sin reaccionar dentro del polímero, de ésta manera se puede suponer que el reactivo entrecruzante fue consumido durante la reacción eficientemente y eliminado durante el lavado con una solución acuosa de NaOH.

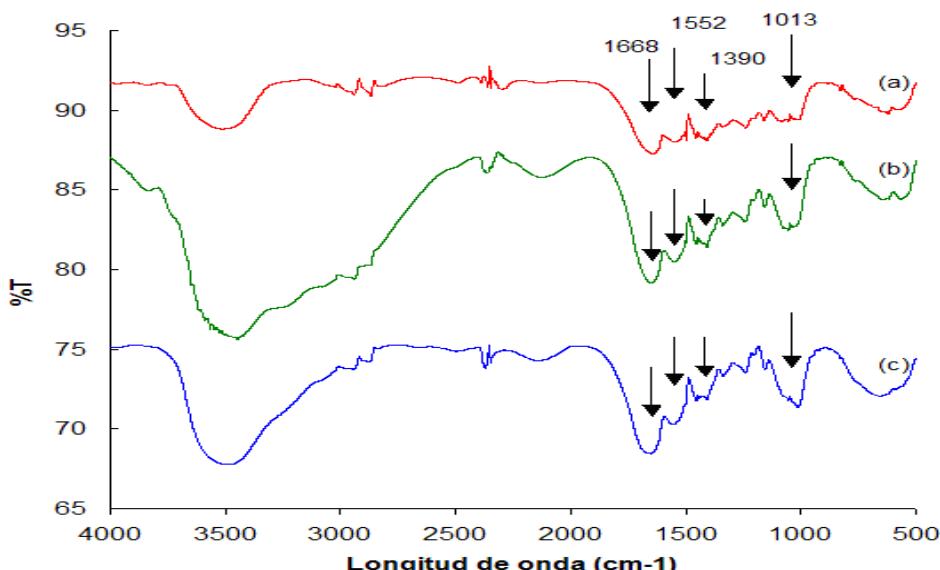


Figura 10. Espectros de FTIR de los biomateriales de gel/quitosano/dextrano secados a 30°C: (a) 0,25, (b) 0,5 y (c) 1,0 % peso de glutaraldehído (1,5 mL de solución de glutaraldehído).

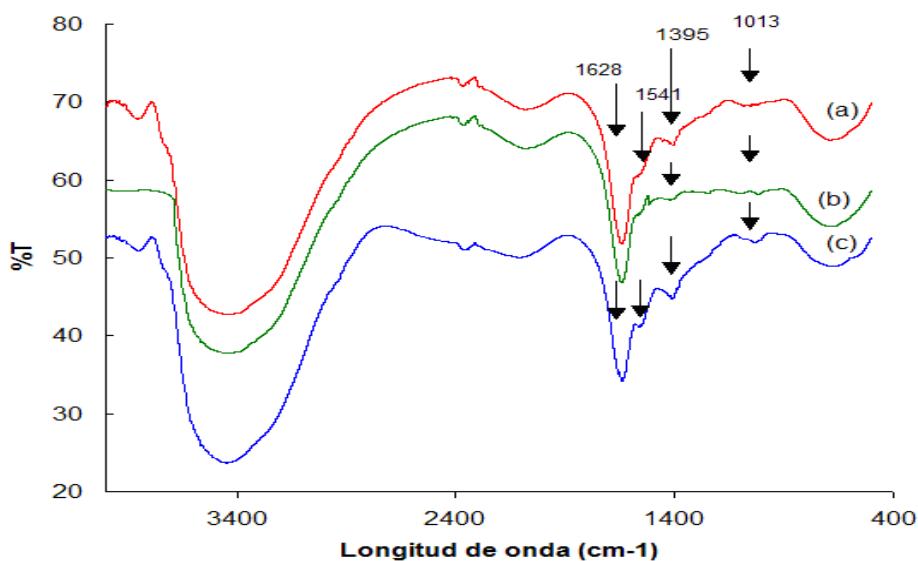


Figura 11. Espectros de FTIR de los biomateriales de gel/quitosano/dextrano secados a 30°C: (a) 0,25, (b) 0,5 y (c) 1,0 % peso de glutaraldehído (3 mL de solución de glutaraldehído).

3.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC). La Figura 12 muestra las curvas calorimétricas de las muestras de gelatina/dextrano, gelatina/quitosano, quitosano/dextrano,

gel/quitosano/dextrano 0,25% peso, 30°C, 1,5 mL, gel/quitosano/dextrano 0,25% peso, 30°C, 3 mL, gel/quitosano/dextrano 0,25% peso, -10°C, 1,5 mL, gel/quitosano/dextrano 0,25% peso, -10°C, 3 mL. Hay una inflexión en la curva calorimétrica a 18°C, característica de la reacción de entrecruzamiento de la gelatina con el quitosano y -8°C del dextrano. También podemos observar en la Figura 12, que la muestra de quitosano/dextrano no se encuentra la inflexión característica de la red de gelatina/quitosano y finalmente las inflexiones que aparecen abajo de los 100°C se deben a la deshidratación de moléculas de agua atrapadas dentro de las cadenas de la matriz del polímero ya sea que el agua este libre o ligadas a grupos hidrófilos a lo largo de las cadenas de la matriz del polímero como lo mencionan Berger [2] y Mao [5] en trabajos previos al sintetizar redes híbridas de polímeros a partir de gelatina y quitosano.

En los resultados obtenidos mediante la calorimetría diferencial de barrido, se observa un cambio estructural entre las muestras secadas a 30°C por horno de vacío con respecto a las secadas por liofilización a una temperatura de -10°C (véase la Figura 12), donde las secadas por liofilización muestran una fusión de cristales lo que provoca una ancha inflexión de 22 a 150°C, tal cambio se debe a que en las muestras secadas por medio de liofilización las cadenas de los biopolímeros al entrecruzarse se acomodan estructuralmente de una forma más compacta a diferencia de lo que sucede en un horno de vacío donde la evaporación rápida del solvente produce un biopolímero con cadenas más desordenadas, resultando en un biopolímero más amorfó, a diferencia de cuando se seca por liofilización que produce un polímero más cristalino que se puede confirmar visualmente por su color blanco y opaco (Figuras 8 y 9). En el caso de la formación de enlaces covalentes entre las cadenas de quitosano-gelatina, gelatina-gelatina y quitosano-quitosano dentro de la matriz del polímero y el dextrano este atrapado físicamente dentro de esta matriz polimérica, no significa que no puedan existir otro tipo de interacciones entre el dextrano y la red de gelatina/quitosano, esto se puede sustentar debido a los trabajos anteriormente realizados con este tipo de polímeros realizados por Berger [2].

3.3. Microscopia electrónica de barrido (SEM). En la Figura 13 se muestra una micrografía superficial, para una muestra seca sintetizada por medio de horno de vacío a 30°C con 1,5 mL de solución de glutaraldehído al 1,0% peso, en la cual podemos apreciar su superficie regular y homogénea para lo cual se puede decir que el método usado para sintetizarla y su agitación durante el proceso fueron las adecuadas para la síntesis de éstas. De igual manera se puede apreciar al centro de la fotografía partículas blancas sobre la superficie pero que no forman parte de ella, las cuales son láminas del polímero más delgadas y que se formaron al hacer el corte de la muestra.

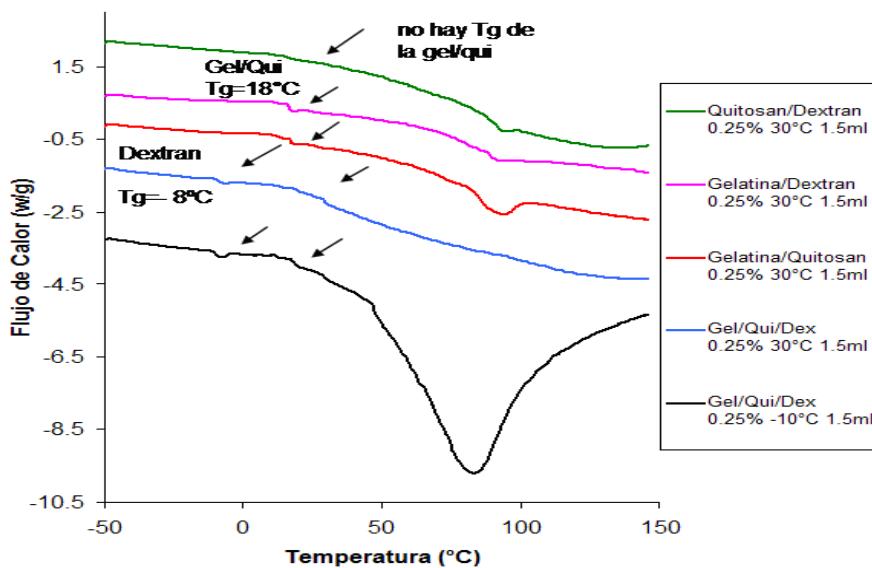


Figura 12. Curvas calorimétricas de gelatina/dextrano, gelatina/quitosano, quitosano/dextrano, Gel/Qui/Dex 0,25% peso 30°C 1,5 mL, Gel/Qui/Dex 0,25% peso -10°C 1,5 mL.

En las Figuras 14-16, se muestra la superficie de la muestra hinchada en agua a temperatura ambiente de la HPN de Gel/Qui/Dex, sintetizada en horno de vacío a 30°C con 1,5 mL de solución de glutaraldehído al 1,0% peso, en la micrografía se pueden observar pequeños poros en la superficie de la misma (Figura 14), ampliada 500 veces (Figura 15) y 1.000 veces (Figura 16) observándose en detalle la superficie y sus irregularidades causadas por la superficie porosa que va haciéndose cada vez más evidente en las micrografías conforme aumentamos el acercamiento a éstas, en comparación con la superficie lisa de las micrografías de las muestras en estado seco (Figura 13).

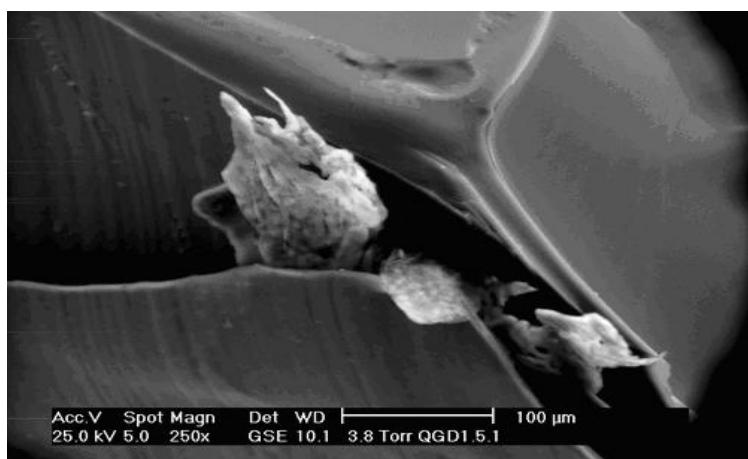


Figura 13 Micrografía de la superficie de la muestra de Gel/Qui/Dex seca, sintetizada en horno de vacío a 30°C con 1,5 mL de solución de glutaraldehído al 1,0% peso, ampliada 250 veces.

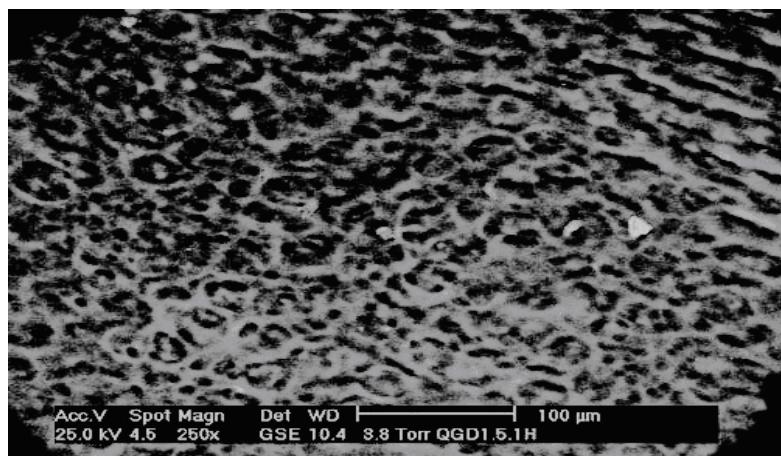


Figura 14. Micrografía de la superficie de la muestra de Gel/Qui/Dex hinchada con agua, sintetizada en horno de vacío a 30°C con 1,5 mL de solución de glutaraldehído al 1,0% peso, ampliada 250 veces.

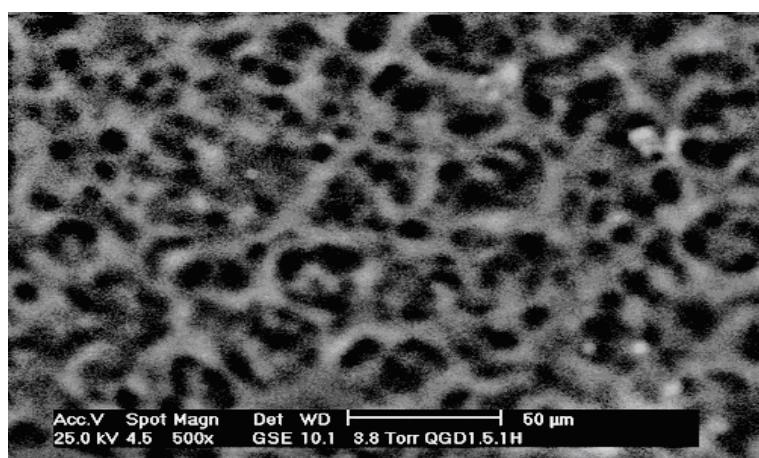


Figura 15. Micrografía de la superficie de la muestra de Gel/Qui/Dex hinchada con agua, sintetizada en horno de vacío a 30°C con 1,5 mL de solución de glutaraldehído al 1,0 % peso, ampliada 500 veces.

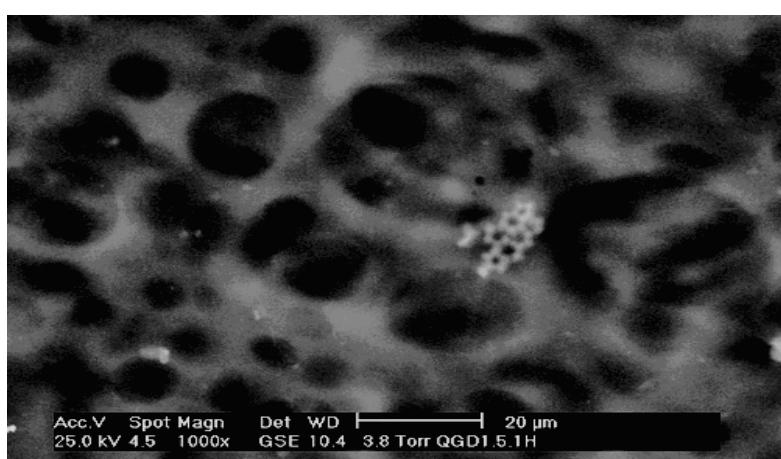


Figura 16. Micrografía de la superficie de la muestra de Gel/Qui/Dex hinchada con agua, sintetizada en horno de vacío a 30°C con 1,5 mL de solución de glutaraldehído al 1,0 % peso, ampliada 1.000 veces.

En las micrografías de las Figuras 14 a la 16 se observa la superficie porosa del polímero la cual es irregular en sus poros y el tamaño promedio de éstos que van de 5 a 20 μm . En la Figura 17 podemos observar una micrografía de la superficie seca de la muestra, sintetizada por liofilización a -10°C con 1,5 mL de solución de glutaraldehído al 0,25 % peso, ampliada 250 veces, en la cual a diferencia de las sintetizadas en horno de vacío, presentan una superficie porosa visible a simple vista, en la cual por medio del SEM podemos apreciar en detalle los poros de tamaños diversos (5 a 100 μm) distribuidos a lo largo de la superficie.

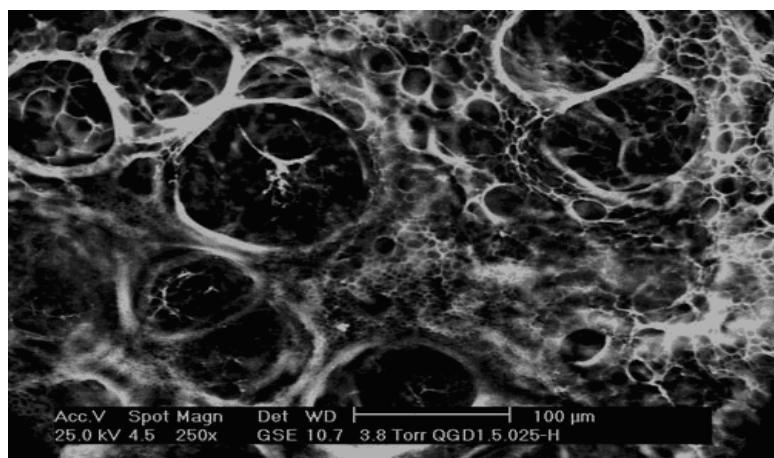


Figura 17. Micrografía de la superficie de la muestra de Gel/Qui/Dex seca, sintetizada por liofilización con 1,5 mL de solución de glutaraldehído al 0,25 % peso, ampliada 250 veces.

En las Figuras 18 y 19 podemos observar una micrografía de un corte transversal de una muestra de Gel/Qui/Dex hinchada en agua a temperatura ambiente. Por el método de secado por liofilización, se obtuvieron materiales en forma de esponja o espuma de color blanco, de muy buena apariencia, homogéneas y de superficie áspera y porosa, que al hincharse en el medio acuoso aumentan en su volumen absorbiendo el agua del medio, obteniendo estas una apariencia casi transparente más parecidas a un gel pero sin perder su cohesión y suaves al tacto. Tomando en cuenta que la variedad de tamaños de poros dentro y fuera de las muestras secadas tanto en horno de vacío como por liofilización, se determinó un tamaño de poro promedio para las muestras secadas en horno de vacío a 30°C que van de 8 a 18 μm , donde para las muestras secadas por liofilización a -10°C se determinó un tamaño de poro promedio de 46 a 100 μm , éste cálculo se hizo de forma manual tomando en cuenta la escala que proporciona la micrografía, midiendo los poros manualmente y tomando una muestra desde la micrografía de aproximadamente 50 poros y de esta muestra se sacó un promedio de tamaño de poro.

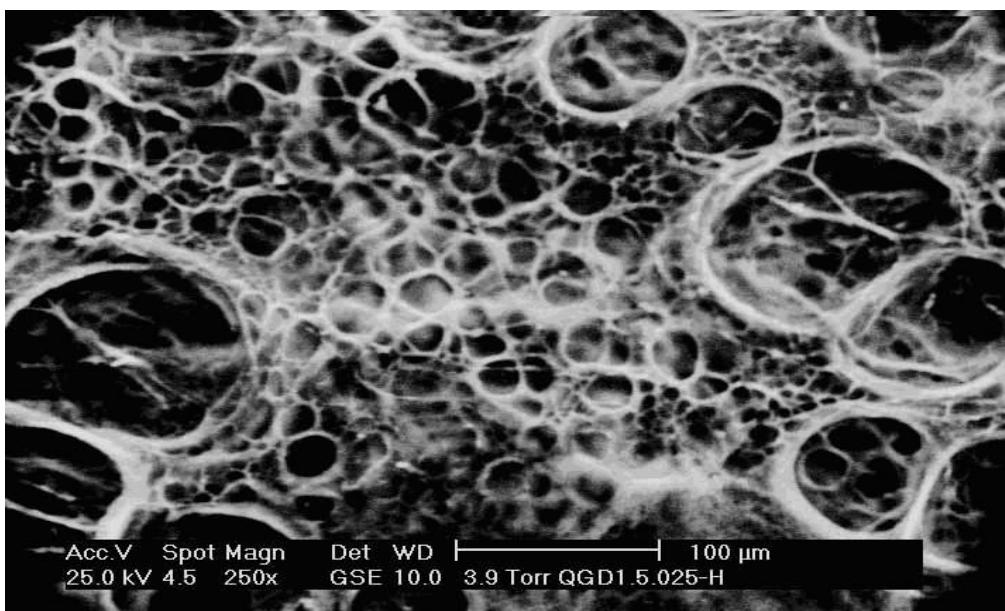


Figura 18. Micrografía del biomaterial de Gel/Qui/Dex secado por liofilización a -10°C (corte transversal), ampliada 250 veces.

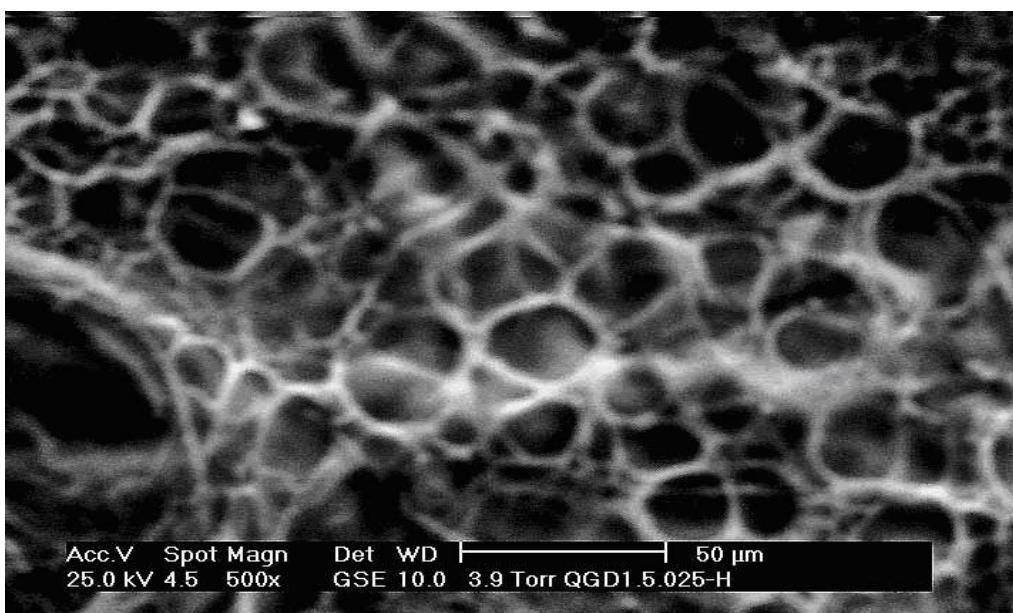


Figura 19. Micrografía del biomaterial de Gel/Qui/Dex secado por liofilización a -10°C (corte transversal), ampliada 500 veces hinchado en agua.

Estos resultados obtenidos por SEM se pueden comparar con los reportados por *Mao* [5] que sintetizó biomateriales de gelatina/quitosano y reportó que el tamaño de los poros puede ser modulado en el intervalo de los 50 a 300 μm , cambiando la temperatura y velocidad de pre-enfriamiento (la muestra se preenfría de -20 a -40°C en una bandeja de aluminio, después de este tratamiento se liofilizan las muestras. También reporta que el tamaño de los poros se hace más pequeño y las paredes de los poros más delgada mientras que la interconectividad incrementa

conforme declina la temperatura de pre-enfriamiento. En las micrografías tomadas por medio de SEM se puede observar también, la marcada diferencia morfológica y estructural con respecto a las muestras de gel/qui/dex sintetizadas en horno de vacío y una sintetizada por liofilización, siendo la superficie, y el interior de éstas totalmente diferentes entre sí. En las Figuras 14 a la 17 se comparan dos muestras por cada método donde solo varía la cantidad de solución de glutaraldehído utilizada durante la síntesis.

3.4. Porcentaje de absorción de agua. En la Tabla 1 se puede observar que para las muestras secadas a 30°C en un horno de vacío el mayor grado de hinchamiento se obtuvo para la muestra sintetizada con 1% en peso de solución acuosa de glutaraldehído como agente entrecruzante y expuesta a un medio con un pH 2 a las 96 horas.

Tabla 1. Porcentajes de absorción obtenidos para las muestras secadas en horno de vacío a 30°C, hinchadas a pHs de 2, 4 y 7.

<i>pH</i> % glutaraldehído	2 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
pH 2_0,25	1.622	2.553			
pH 4_0,25	650	751	765	795	824
pH 7_0,25	525	661	741	718	817
pH 2_0,5	1.986	2.779	3.112	-	-
pH 4_0,5	508	575	617	643	690
pH 7_0,5	498	570	602	647	697
pH 2_1,0	1.819	2.977	3.221	3.437	3.546
pH 4_1,0	468	499	562	568	635
pH 7_1,0	492	558	609	602	666

El grado de hinchamiento depende del pH del medio. Esto puede ser explicado por el hecho que los enlaces de hidrógeno internos del HPN de la gelatina/quitosano/dextrano se disocian en medio ácido y este proceso de disociación tiene lugar de forma gradual. Así mismo, hay una característica dependiente similar en el hinchamiento y la liberación de fármacos, debido a la disociación de los enlaces de hidrógeno de los grupos amino del quitosano junto con los grupos amino protonizados en el medio ácido. Por otro lado, se puede observar en la Tabla 1 que a un pH menor hay un mayor porcentaje de absorción, pero así mismo, en un pH 2 las películas sintetizadas

con menor concentración de glutaraldehído presentan degradación y posteriormente se disuelven en el medio aproximadamente a las 24 horas, debido a que por su baja densidad de entrecruzamiento hay muchos más sitios activos a lo largo de la cadena para protonar, es entonces que se llega a un punto en que las cadenas dentro de la matriz empiezan a romperse y la red se disuelve en el medio acuoso. Por otro lado, esto no sucede en un pH de 4 y 7 y en pH 2 por haber sido sintetizados con una mayor concentración de agente entrecruzante glutaraldehído, por lo tanto, el quitosano/gelatina/dextrano al estar mayormente entrecruzados decrece la habilidad de éstos para formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua.

Tabla 2. Porcentajes de absorción obtenidos para las muestras secadas por liofilización a -10°C hinchadas a los pH's de 2, 4 y 7.

pH/%GL/mL	2 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
pH2_0,25_1,5	2.568	3.869			
pH4_0,25_1,5	1.235	1.361	1.347	1.502	1.390
pH7_0,25_1,5	1.026	1.715	1.458	1.438	1.641
pH2_0,5_1,5	2.393	3.360	3.852	-	-
pH4_0,5_1,5	1.104	1.285	1.364	1.397	1.478
pH7_0,5_1,5	1.039	1.270	1.383	1.453	1.516
pH2_1,0_1,5	2.202	2.872	3.153	3.231	3.093
pH4_1,0_1,5	1.087	1.209	1.163	1.220	1.302
pH7_1,0_1,5	1.177	1.318	1.396	1.526	1.442

En las muestras sintetizadas a -10°C y secadas por liofilización, se obtuvo el mayor porcentaje de absorción en la muestra sintetizada con 0,25% en peso de solución de glutaraldehído, observándose una disociación de las cadenas del HPN a las 24 horas a un pH 2 (Tabla 2), el grado de absorción se incrementó debido a dos factores antes discutidos, la densidad de entrecruzado y el tamaño de los poros o espacios intermoleculares, basándonos en los resultados del FTIR y SEM, podemos decir que las redes en estos materiales presentan muchos más sitios activos donde se puedan formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua a lo largo de la cadena de los polímeros que forman la red del gelatina/quitosano/dextrano en el cual el dextrano se encuentra en gran parte sin reaccionar en estos materiales secados por medio de liofilización (véase los espectros de FTIR, Figuras 10 y 11).

De la misma manera, basándonos también en las micrografías del SEM podemos apreciar la diferencia del tamaño de poros o espacios intermoleculares entre las cadenas de polímeros entrecruzadas, las cuales en estos materiales son mucho mayores a las observadas en las redes sintetizadas y secadas por medio del horno de vacío (véase las micrografías de SEM, Figuras 13 a la 19) dándole estas características morfológicas de las redes secadas por liofilización una capacidad mayor de absorción debido a que las moléculas de agua pueden migrar más fácilmente hacia el interior del material y su matriz polimérica. En la Figura 20 se representa el porcentaje de absorción de agua para una muestra secada por ambos métodos (horno de vacío y liofilización) pertenecientes a las muestras sintetizadas con un 1% en peso de solución acuosa de glutaraldehído e hinchadas en un medio con pH de 2, 4 y 7, se observa en esta gráfica como la capacidad de absorción esta ligada estrechamente a la estructura y arreglo de las cadenas dadas por el método de secado, así mismo el pH del medio acuoso influye fuertemente en su capacidad de absorción.

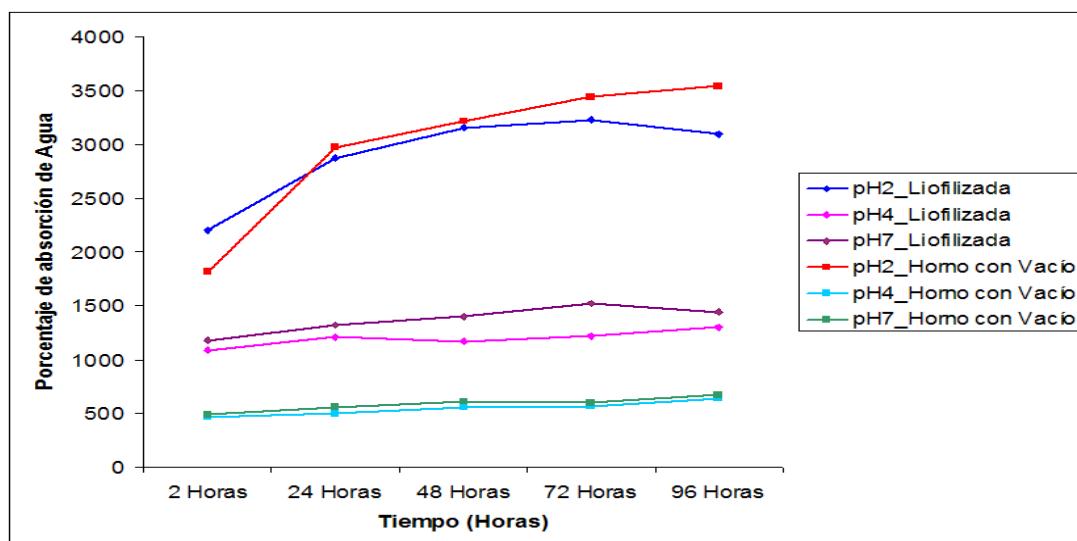


Figura 20. Porcentaje de absorción de agua para las muestras secadas por liofilización y horno de vacío pertenecientes a las muestras sintetizadas con una solución al 1% en peso de glutaraldehído como agente entrecruzante.

3.5. Determinación del porcentaje de absorción de fármaco.

3.6. Análisis reológico.

3.6.1. Curva de Creep y módulo elástico. Para la Figura 21 se muestran todas las curvas para los dos métodos de secado y sus respectivas concentraciones, en las cuales podemos apreciar especialmente que las muestras que muestran mayor entrecruzamiento presentan en la parte viscosa de la curva (aproximadamente a partir de los 150 segundos) una pendiente menor, esta pendiente en las curvas de *Compliance* en función del tiempo va decreciendo conforme el índice de

entrecruzamiento de la muestra es mayor, indicándonos así que son menos viscosas, menos flexibles. De esta manera, los HPN's más flexibles y más viscosas son a las correspondientes a muestra secada por medio de liofilizador a -10°C y sintetizadas con una solución de glutaraldehído al 0,25 y 0,5% en peso seguidas de sus análogas pero secadas por medio de horno de vacío a 30°C y por último las secadas por liofilización y horno de vacío y con la mayor cantidad de entrecruzante (1,0% solución de glutaraldehído).

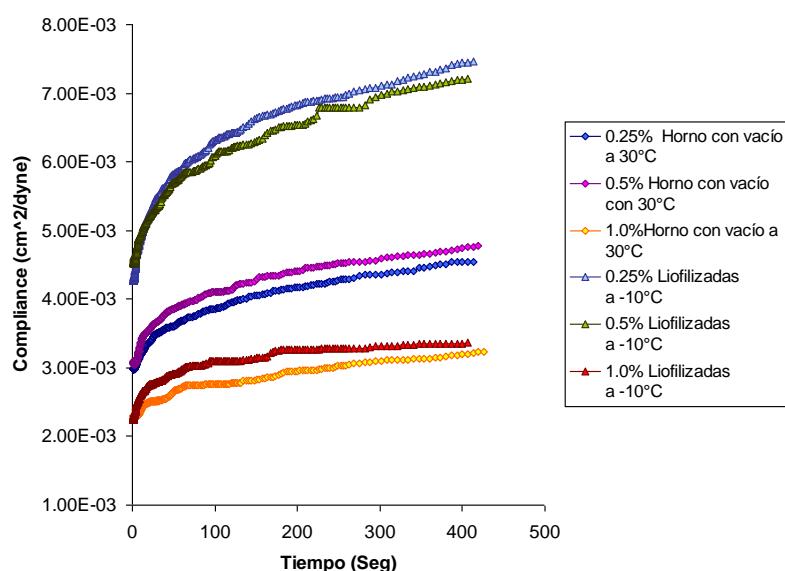


Figura 21. Curvas de *compliance* en función del tiempo, para las muestras secadas por ambos métodos.

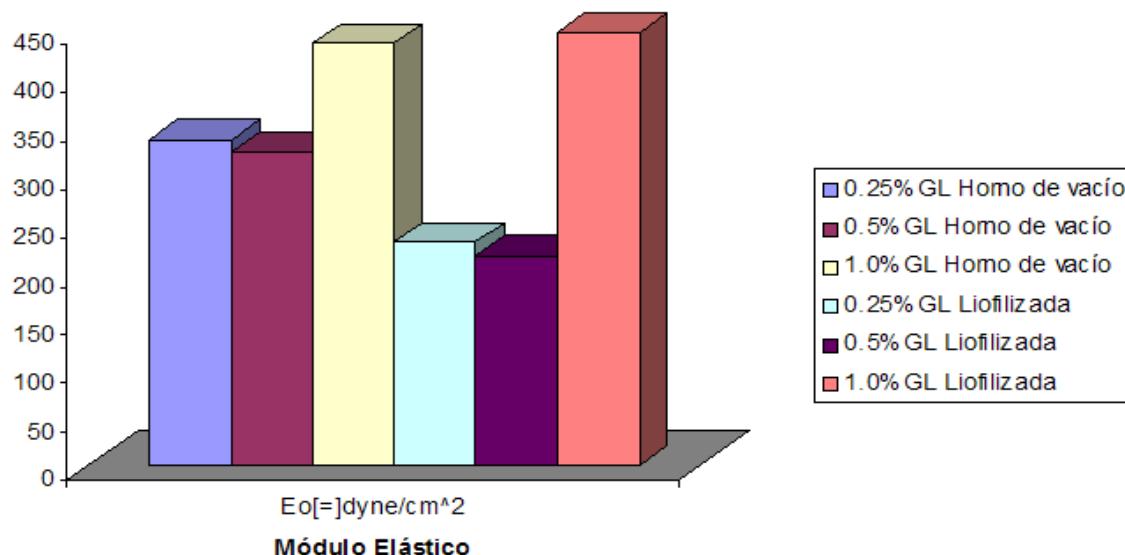


Figura 22. Módulo elástico para las muestras secadas por ambos métodos.

Los HPN's con un mayor módulo elástico cuentan con una resistencia mecánica superior, en este caso las muestras mayormente entrecruzadas obtuvieron módulos elásticos muy similares para ambos métodos de secado como es el caso para las muestras sintetizadas con una solución al 1,0% en peso de solución acuosa de glutaraldehído en ambos métodos y los módulos fueron de 435 y 436 dina/cm² para las muestras secadas por horno de vacío y por liofilización, respectivamente (véase la Figura 22 y la Tabla 3). El módulo elástico disminuye en las muestras secadas por medio de liofilización en el caso de las sintetizadas con 0,25 y 0,5% de solución acuosa de glutaraldehído como entrecruzante, éste comportamiento se debe a que como se observa en la Figura 21 las muestras un mayor *compliance* son las que presentan un mayor comportamiento viscoso y así mismo son más flexibles que las secadas por horno de vacío esto se refleja en un módulo elástico menor, es decir, son más flexibles pero sus propiedades mecánicas y resistencia se ven disminuidas.

Tabla 3. Módulos elásticos para las muestras secadas por ambos métodos.

<i>HPN's ambos métodos de secado.</i>	<i>Módulo elástico E_o dina/cm²</i>
0,25% GL Horno de vacío	3,36E+02
0,5% GL Horno de vacío	3,23E+02
1,0% GL Horno de vacío	4,35E+02
0,25% GL Liofilizada	2,31E+02
0,5% GL Liofilizada	2,16E+02
1,0% GL Liofilizada	4,46E+02

CONCLUSIONES

De acuerdo a los análisis de FTIR y DSC confirmamos la presencia de una red híbrida de polímeros (HPN) debido a que las reacciones de entrecruzamiento suceden entre las cadenas de los polímeros de la gelatina-quitosano, gelatina-gelatina, quitosano-quitosano observándose una sola temperatura de transición vítrea (18 y 21°C) para la gelatina y el quitosano. Así mismo, el dextrano queda entrecruzado consigo mismo dentro de la matriz del polímero, aunque no se puede asegurar en esta clase de redes que el dextrano no esté entrecruzado con las cadenas del quitosano y gelatina en algunas partes de la cadena pero en menor medida. Por medio del SEM se observó una morfología porosa, característica de este tipo de materiales, determinándose un tamaño de poro

promedio de 5 a 20 μm sobre la superficie en las muestras secadas por medio de horno de vacío a 30°C y de 5 a 100 μm para las muestras secadas por medio de liofilización. La capacidad de absorción de estos biomateriales se ve favorecida en un pH ácido debido a que el medio ácido favorece la dissociación de los enlaces por enlace de hidrógeno relacionados a los grupos funcionales NH₂ y OH, además de la baja concentración del entrecruzante empleado en su elaboración que favorece la absorción por haber dentro de la matriz del polímero más sitios activos en las cuales las moléculas de agua puedan formar enlaces de hidrógeno con los grupos amino y OH del quitosano, gelatina y dextrano que puedan encontrarse libres dentro de la matriz del polímero. Las pruebas reológicas nos mostraron que si se desea influir en las propiedades mecánicas de las materiales sintetizados debemos de controlar principalmente la concentración del glutaraldehído como agente entrecruzante, obteniendo materiales con mejores propiedades mecánicas a mayores concentraciones de glutaraldehído, obteniéndose materiales con un módulo elástico mayor, es decir su estructura mecánica es superior inicialmente pero tienen tendencia a ser menos flexibles debido a su rigidez, de igual manera a concentraciones de glutaraldehído menores, se obtienen materiales más flexibles y con una capacidad superior de absorción, pero con propiedades mecánicas inferiores a las muestras sintetizadas con una mayor cantidad de agente entrecruzante. Concluyendo que los biomateriales sintetizadas en este trabajo, por sus características morfológicas, térmicas y su gran capacidad de absorción, ya sea por secado en horno de vacío o secado por liofilización, prometen ser excelentes candidatos para su uso en medicina como soportes para tejido interconectivo o liberadores de fármacos.

REFERENCIAS

- [1] Baxter A, Dillon M, Taylor KDA, Roberts GAF “Improved method for IR determination of the degree of N-acetylation of chitosan”, *Int. J. Biol. Macromol.*, **14**, 166 (1992)
- [2] Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R, *Eur. J. Pharmaceutics & Biopharmaceutics*, **57**, 29 (2004)
- [3] Griffith LG, *Polymeric Biomaterials*, www.elsevier.com/locate/actamat, p 264 (1999)
- [4] Kaplan DL “Biopolymers from Renewable Resources”, Editorial Springer, p 10-16, (1998)
- [5] Katime I, Novoa R, Díaz de Apodaca E, Mendizábal E, Puig J, *Polymer Testing*, **18**(7), 559 (1999); Mao, Jin Shu, Zhao, Li Guo, Yin, Yu Ji, Yao, Kang De, “Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds”, *Biomaterials*, **24**, 1067 (2003)
- [6] Navarro JM, Mansan P, *Ann Microbiol.*, **127**, 295 (1976)
- [7] Oyrtón AC, Monteiro Jr, Airoldi C, “Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system”, *Intern. J. Biological Macromolecules*, **26**, 119 (1999)
- [8] Pangburn SH, Trescony PV, Heller J en “*Chitin, chitosan and related enzymes*”. Zikakis JP (Editor), Harcourt Brace Janovich, Nueva York, 1984
- [9] Katime I, Katime O, Katime D “*Los materiales inteligentes de este Milenio: los hidrogeles polímeros*”. Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco, Bilbao 2004; Peppas NA, *Hydrogels in*

Medicine and Pharmacy, 1 (1986)

[10] Price LN, Ryntz RA, Li XH, Huestos AH, Xiao HX, Frisch KC, Suthar B “Investigation of the effects of formulation on selected properties of curable IPN coatings (ultraviolet; interpenetrating polymer networks)”, *J. coatings technology*, **70**, 151 (1998)