

Análisis de las condiciones de esterilización y almacenamiento de las soluciones formadoras de un gel de quitosano con uso potencial como adhesivo para huesos

Marcela Peña García
Asesor: Felipe Salcedo

Departamento de Ingeniería Química. Universidad de los Andes, Colombia

Resumen: *En el presente trabajo se continúa con la investigación para el desarrollo de un gel a base de quitosano con uso potencial como adhesivo óseo, compuesto de quitosano, carbonato de calcio, hidroxiapatita y glutaraldehído. En primer lugar, se realiza una comparación entre la efectividad de la microfiltración contra la efectividad del autoclavado como método de esterilización del agente entrecruzante del producto. Se encontró que la microfiltración es un método de esterilización efectivo. Adicionalmente, es necesario determinar las condiciones más adecuadas para almacenar las soluciones que conforman el gel. Para esto, se realiza una comparación entre el módulo elástico y el tiempo de gelificación de los geles preparados con soluciones almacenadas a temperatura ambiente y a 4°C. Se encontró que luego de dos semanas, el módulo G' de los geles aumentaba, especialmente para aquellos preparados con soluciones almacenadas a 4°C. Finalmente, se realizó una medición de la viscosidad y el pH de todas las soluciones formadoras luego de dos semanas, con el fin de determinar si estas propiedades no cambiaban en el tiempo. Se encontró que la viscosidad varía más para las soluciones de quitosano y carbonato de calcio+hidroxiapatita, mientras que el pH varía más para la solución de glutaraldehído, dependiendo del método de esterilización usado para esta última solución.*

Palabras clave: *Quitosano, adhesivo, microfiltración, almacenamiento, módulo elástico*

1. Introducción

El interés en el desarrollo de biopolímeros con aplicaciones médicas ha crecido en los últimos años, debido a la versatilidad de estos materiales y su potencial de ser utilizados como dispositivos terapéuticos cardiovasculares, dispositivos ortopédicos, sustitutos de tejidos y órganos, entre otros [1]. Dentro de estas aplicaciones se encuentra el tratamiento de fracturas conminutas, con el fin de reemplazar el procedimiento de fijación interna de los huesos mediante varillas, tornillos o placas de metal [2].

Una posible alternativa al procedimiento de fijación interna, es el desarrollo de un adhesivo para huesos a base de quitosano. Dentro de las características que debe tener el gel desarrollado se encuentran la facilidad de aplicación, alta fuerza de adhesión en el hueso, rápida acción, biocompatibilidad, que no afecte la osteogénesis y que actúe en ambientes húmedos, entre otras. Asimismo, el gel debe cumplir con ciertas especificaciones tales como resistencia a la tracción en la unión (TBS) superior a 0.2 MPa, viscosidad de solución menor a 10 Pa·s, un tiempo de gelificación menor a 10 minutos, no debe ser citotóxico y debe ser esterilizable [3].

En la Universidad de los Andes se ha llevado a cabo una investigación para desarrollar un hidrogel adhesivo compuesto de quitosano, carbonato de calcio, hidroxiapatita y glutaraldehído. La formulación del gel corresponde a la formulación con mejores resultados encontrada en estudios previos [4]. De esta forma, el gel se prepara con proporciones p/v de 2% de quitosano, 4% de carbonato de calcio y 4% de hidroxiapatita. Como solvente se utiliza ácido acético 1% v/v y como agente entrecruzante se utiliza una solución de glutaraldehído 0.003 mM.

Por otro lado, con respecto a las propiedades del gel desarrollado, este tiene un comportamiento elástico sólido, con un módulo elástico de 10^5 Pa, gelifica en 13 minutos y no es citotóxico [5] [6]. Adicionalmente, tiene una resistencia a la tracción en la unión (TBS) adhesivo-hueso superior a 0.26 MPa en medio seco y 0.22 MPa en medio húmedo [7]. Inicialmente, el producto tiene una consistencia líquida, la cual cambia progresivamente a una consistencia gelatinosa, lo que permite la adhesión al hueso.

El quitosano, el cual es el principal componente del gel, es un copolímero policatiónico de glucosamina y N-acetilglucosamina, derivado de la desacetilación parcial de la quitina por hidrólisis química o enzimática [8]. La quitina es uno de los biopolímeros más abundantes y se encuentra comúnmente en crustáceos, insectos, algunos hongos, paredes celulares de algas y levaduras [8]. El quitosano ha sido estudiado en numerosas aplicaciones como sistemas de liberación controlada de medicamentos, tratamiento de heridas, anticoagulantes y en ingeniería de tejidos óseos y cartilagosos. Esto se debe a que es un polímero biocompatible, biodegradable y mucoadhesivo [9]. A pesar de esto, su naturaleza higroscópica, las variaciones en peso molecular, su pureza y grado de desacetilación dependientes de la fuente de origen de quitina, han impedido la disponibilidad de un amplio rango de productos farmacéuticos hechos a base de quitosano [9].

El glutaraldehído es un agente entrecruzante soluble en agua y distintos solventes orgánicos, el cual se utiliza ampliamente en la industria química debido a su alta disponibilidad comercial, alta reactividad y su eficiencia en cuanto a la formación de enlaces químicamente estables [10]. En soluciones alcalinas con concentraciones superiores al 2%, tiene propiedades desinfectantes, por lo cual es utilizado como agente esterilizante [11]. En soluciones acuosas, la estructura del glutaraldehído no se limita a su forma monomérica. La estructura que tenga el glutaraldehído en la solución depende del pH, la temperatura y la concentración. En la figura 1 pueden observarse las diferentes estructuras del glutaraldehído en solución acuosa [10].

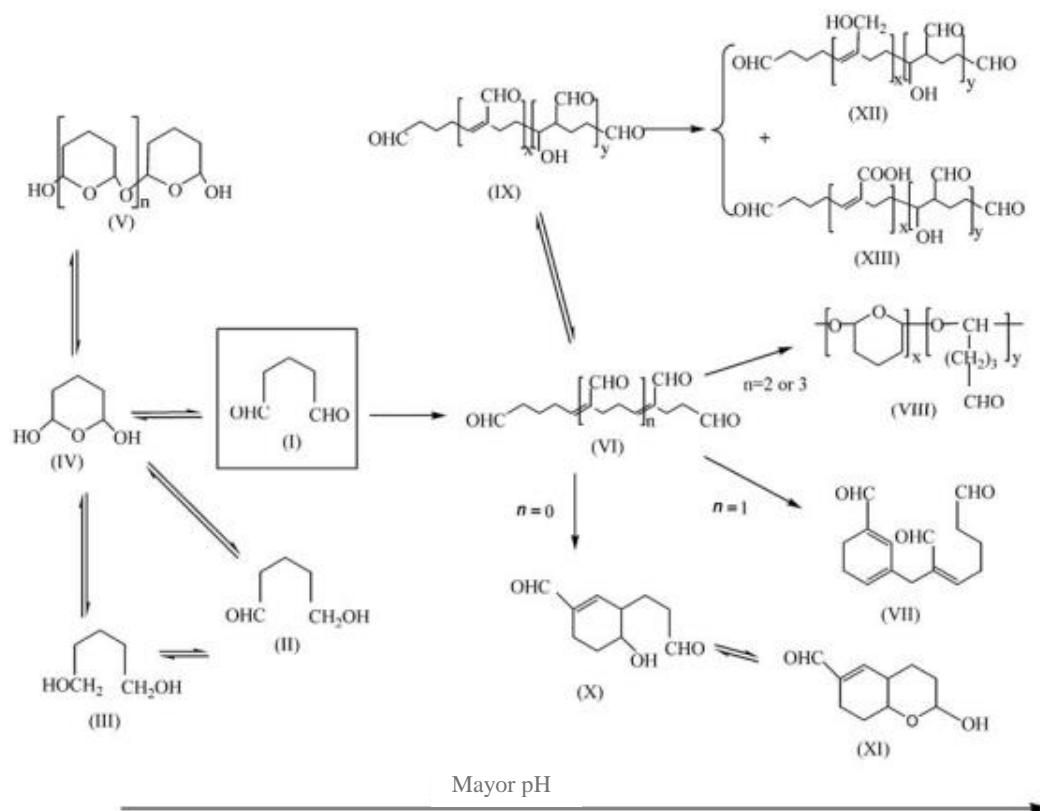


Figura 1. Estructuras de glutaraldehído en solución acuosa [10]

Teniendo en cuenta que el producto se utilizará en seres humanos, es necesario asegurar que el adhesivo a base de quitosano sea estéril, para evitar la proliferación de microorganismos que pueda causar infecciones o enfermedades. Es por esto que en estudios anteriores [12] se estableció un protocolo de esterilización mediante autoclavado para las soluciones de quitosano, carbonato de calcio (CHP) y glutaraldehído, puesto que es un método de alta disponibilidad. Sin embargo, en estudios previos se ha observado que autoclavar las soluciones disminuye los módulos elástico y viscoso del gel y la gelificación ocurre en un menor tiempo, comparado con a geles no estériles [5] [4]. Se encontró que la solución de glutaraldehído es responsable de estos cambios en el gel, luego de ser esterilizada. El proceso de esterilización altera el espectro UV-vis, lo cual implica un cambio en la estructura química del glutaraldehído en la solución [12]. Por esta razón, se propuso estudiar la efectividad de la microfiltración, como método alternativo de esterilización para el agente entrecruzante.

La microfiltración es un proceso de separación física, cuya efectividad para remover microorganismos y sólidos disueltos depende del tamaño del poro del filtro utilizado. Este proceso es altamente efectivo para remover completamente los microorganismos presentes en una solución, sin embargo, no remueve en su totalidad los virus, endotoxinas y otros agentes patógenos [13]. El tamaño de poro recomendado para la eliminación de bacterias se encuentra en un rango de 0.45 a 0.22 μm [14].

Por otra parte, es necesario determinar el tiempo y las condiciones de almacenamiento adecuadas para las soluciones que conforman el gel, es decir, el tiempo en el cual pueden permanecer almacenadas antes de que ya no sea adecuado para ser utilizado. Esto se debe a que la rápida gelificación del producto hace necesaria su aplicación inmediata, para evitar que pierda adhesividad. En este caso, es necesario determinar por cuánto tiempo las soluciones que conforman el gel permanecen sin cambios que puedan afectar las propiedades del producto final, como separación de fases, cambios en su viscosidad o crecimiento bacteriano [15].

En el caso del quitosano, los factores externos que afectan su estabilidad en solución son la temperatura y la humedad relativa [9]. A temperatura ambiente o temperaturas elevadas, la tasa de degradación de quitosano aumenta, por lo cual se sugiere que las soluciones sean almacenadas a temperaturas entre 2 y 8°C [16]. Adicionalmente, se ha encontrado que a humedades relativas altas (superiores a 40%) la absorción de agua en materiales hechos a base de quitosano presentan una difusión que no puede describirse mediante la ley de Fick, lo cual causa una disminución en las propiedades mecánicas de los materiales [17] [18]. Asimismo, una alta humedad relativa puede disminuir las propiedades mucoadhesivas del quitosano, debido a cambios en los grupos funcionales de la molécula [9]. Adicionalmente, el método de esterilización también es un factor que influye en la estabilidad del quitosano. Se ha encontrado que la solubilidad y la tenacidad de películas preparadas a base de quitosano y ácido acético disminuyen luego de ser sometidas a un proceso de autoclavado [19]. Sin embargo, hay estudios contradictorios en este aspecto, pues hay estudios que sugieren que el autoclavado sí es un método viable de esterilización que no cambia las propiedades del quitosano [20].

Para el caso del agente entrecruzante, se recomienda almacenar soluciones acuosas de glutaraldehído a 25°C o en refrigeración, puesto que una exposición prolongada a altas temperaturas promueve la descomposición del glutaraldehído. Adicionalmente, a altas temperaturas el pH de soluciones concentradas de glutaraldehído (superiores a 15% v/v), disminuye progresivamente. Por otro lado, a temperatura de congelación se presenta estratificación en las soluciones. El tiempo de almacenamiento sugerido se encuentra entre 6 meses y un año [21].

La estabilidad de las soluciones de hidroxiapatita y carbonato de calcio no ha sido estudiada extensamente. Sin embargo, se ha encontrado que a 37°C, soluciones de hidroxiapatita en ácido acético 3% v/v presentan aumentos en su solubilidad y absorción. El aumento en estas propiedades es mayor entre mayor sea el tiempo de almacenamiento [22].

En el presente trabajo se realiza una comparación entre la efectividad de la microfiltración y la efectividad del autoclavado como métodos de esterilización para la solución de glutaraldehído 0.003 mM y se analiza el comportamiento de los módulos elástico y viscoso de geles preparados con soluciones almacenadas a diferentes condiciones, con el fin de determinar el efecto de estas en las propiedades del gel.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Establecer el efecto de las condiciones de esterilización y almacenamiento de las soluciones que conforman un gel de quitosano, sobre las propiedades reológicas del mismo.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar la efectividad de la microfiltración con la efectividad del autoclavado como método de esterilización para una solución de glutaraldehído 0.003 mM.
- Determinar si hay cambios en la viscosidad y pH en las soluciones formadoras de gel al almacenarlas por un período de 15 días.
- Determinar las condiciones más apropiadas de almacenamiento para las soluciones formadoras del gel de quitosano.

3. Materiales y métodos

Para la preparación del gel se utilizó quitosano de peso molecular medio (Sigma Aldrich 448877-250G), carbonato de calcio (Panreac), hidroxiapatita (Sigma Aldrich), glutaraldehído (Panreac) y ácido acético. A continuación se describe la metodología utilizada durante la realización del proyecto.

3.1. Comparación entre los métodos de esterilización para el agente entrecruzante

Preparación del gel

Para preparar un gel no estéril, primero se prepara una solución de quitosano al 2.5% p/v en 20 ml de ácido acético. Esta solución se mezcla en un agitador mecánico con un impeller de hélice de 3 láminas y 55 mm de diámetro, a una velocidad de 450 rpm durante 15 minutos. Esta solución debe dejarse reposar durante 24 horas, con el fin de asegurar que el quitosano se disuelva completamente en el ácido. Por otro lado, para preparar la solución de carbonato e hidroxiapatita (CHP), se agrega 1 gramo de carbonato de calcio y 1 gramo de hidroxiapatita a 5 ml de ácido acético 1% v/v. Esta solución se agita durante 3 minutos utilizando una propela dispersora de peso ligero adaptada a una batidora manual, a la velocidad más baja de la batidora. Finalmente, en un balón aforado de 50 ml se añaden 56 µl de glutaraldehído 25% v/v y se afora con agua desionizada hasta la marca.

Una vez preparadas las soluciones, se mezcla la solución de quitosano y la solución CHP durante 5 minutos, utilizando la propela de la batidora manual a la velocidad más baja. Por último, se agrega la solución de glutaraldehído y toda la mezcla se agita durante un minuto con la misma propela utilizada anteriormente.

Protocolo de esterilización

El protocolo de esterilización actual [12] consiste en someter la solución de quitosano y la solución de CHP a un ciclo de autoclavado de 15 minutos a 121°C, durante dos horas. Para esto, la solución de quitosano se envasa en un recipiente Schott y el carbonato de calcio y la hidroxiapatita en polvo se envasan en un tubo Falcon. Asimismo, el ácido acético y el agua utilizada en la preparación del glutaraldehído se esterilizan en tubos Falcon. Una vez concluido el ciclo de autoclavado, se prepara la solución de glutaraldehído 0.003 mM, en una cabina de flujo laminar horizontal en presencia de mechero. Los elementos de vidrio y las propelas necesarias para la preparación del gel deben ser esterilizados previamente, con una solución antiséptica de etanol y posteriormente por exposición a luz ultravioleta durante 15 minutos. Luego se realiza la preparación del gel en la cabina siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Pruebas de crecimiento microbiológico en soluciones de glutaraldehído 0.003 mM

Como método alternativo de esterilización del glutaraldehído, se propone microfiltrar la solución con un microfiltro de PVDF de 0.22 µm, adaptado a una jeringa de 10 ml. Esto con el fin de omitir el paso de autoclavar el agua necesaria para preparar la solución, en el protocolo descrito anteriormente. Este procedimiento también debe llevarse a cabo en la cabina de flujo laminar en presencia de mechero.

Con el fin de comprobar la efectividad de la microfiltración como método de esterilización para el agente entrecruzante, se realizaron pruebas de crecimiento microbiológico utilizando como medio de cultivo agar nutritivo. La composición del medio se muestra a continuación:

Tabla 1. Composición del medio de cultivo

Compuesto	%p/v
Extracto de carne	0.3
Peptona	0.5
Agar-agar	1.2
Cloruro de sodio	0.5

Estos componentes se disuelven en agua desionizada. Posteriormente, se esteriliza la solución del medio de cultivo, junto con cuatro cajas de Petri, rastrillos y una micropipeta con sus respectivas puntas, mediante el ciclo de autoclavado descrito anteriormente. Luego de esto, en una cabina de flujo laminar horizontal en presencia de mechero se añaden aproximadamente 20 ml de la solución del medio de cultivo a cada caja de Petri. Una vez se ha gelificado el medio, se añaden 0.5 ml de la sustancia a la que se expondrá el medio, de acuerdo a lo que se muestra en la tabla 2. Finalmente, las cajas de Petri se sellan con papel parafilm y se introducen en una incubadora a 37°C, durante 7 días.

Tabla 2. Comparación de crecimiento bacteriano en medio de cultivo.

Medio	Muestra
Control [+]	Agua
Control [-]	Medio de cultivo
Glutaraldehído N.E	Solución de glutaraldehído [0.003 mM]
Glutaraldehído autoclavado	Solución de glutaraldehído esterilizada en autoclave [0.003 mM]
Glutaraldehído M.F	Solución de glutaraldehído microfiltrada [0.003 mM]

3.2. Estabilidad de las soluciones formadoras del gel

Con el fin de determinar si las propiedades de las soluciones formadoras del gel permanecen constantes en el tiempo, es decir, permanecen estables, se decidió comparar el valor de la viscosidad y el pH de cada solución luego de dos semanas con el valor de viscosidad medido inmediatamente han sido preparadas. La medición de la viscosidad de las soluciones de quitosano y CHP, se realiza en un viscosímetro (Brookfield DV2T-Extra), mientras que la viscosidad del glutaraldehído debe determinarse a través de una prueba de flujo a 25°C en un reómetro, utilizando una geometría de cilindros concéntricos. Para medir el pH de las soluciones se utilizó un medidor de pH.

3.3. Condiciones de almacenamiento

Las soluciones formadoras del gel se almacenan individualmente luego de ser esterilizadas, durante un período de 15 días. Para este proyecto se escogieron dos temperaturas de almacenamiento: temperatura ambiente y temperatura de refrigeración (4°C). Para esto, se utilizan tubos Falcon esterilizados por autoclavado. Las soluciones almacenadas a temperatura ambiente se ubican lejos de la exposición directa a la luz solar, mientras que las soluciones refrigeradas se almacenan en la nevera del laboratorio.

Diseño experimental

El diseño experimental propuesto para este proyecto es un diseño factorial 2², puesto que se evaluarán dos factores, cada uno con dos niveles. El primer factor es el método de esterilización para el glutaraldehído, teniendo como niveles: Esterilización por autoclavado y por microfiltrado. El segundo factor es la temperatura de almacenamiento de las soluciones que conforman el gel, teniendo como niveles: Temperatura ambiente y temperatura de refrigeración (4°C). Para cada experimento, se requieren 3 réplicas. En la tabla 3 se muestra el diseño experimental propuesto:

Tabla 3. Diseño factorial 2²

Muestra	Método de esterilización	Temperatura de almacenamiento
Gel A	Autoclavado	Ambiente
Gel B	Autoclavado	4°C
Gel C	Microfiltración (glutaraldehído) y autoclavado	Ambiente
Gel D	Microfiltración (glutaraldehído) y autoclavado	4°C

Caracterización reológica

Con el fin de caracterizar los geles elaborados a partir de las soluciones formadoras almacenadas, se realiza una prueba reológica de barrido de tiempo para determinar el módulo elástico (G'), viscoso (G'') y el tiempo de gelificación. La medición se realiza durante 40 minutos, con un porcentaje de deformación fijo de 1%, una frecuencia de 1 Hz y a una temperatura de 37°C. Para esto, se analiza una muestra de gel de 0.5 ml en el reómetro, utilizando una geometría de platos paralelos, con una separación entre platos de 1 mm.

El tiempo de gelificación corresponde al tiempo en el cual la relación entre el módulo elástico y el módulo viscoso alcanza un valor mínimo. Esto se conoce como tangente de delta y se expresa como [23]:

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'} \quad (1)$$

4. Resultados y discusión

4.1 Comparación entre los métodos de esterilización para el agente entrecruzante: Pruebas microbiológicas

En las pruebas de crecimiento bacteriano, como era de esperarse, se observó crecimiento de microorganismos en el control positivo y en el glutaraldehído no estéril (N.E). Adicionalmente, como puede observarse en la figura 2, no hubo proliferación de microorganismos en el glutaraldehído microfiltrado (M.F). Por lo anterior, puede afirmarse que la microfiltración sí es un método efectivo para la esterilización del gel. Se recomienda transferir la solución de glutaraldehído directamente desde el filtro al recipiente donde se prepara el gel, para disminuir el riesgo de contaminación de la solución.

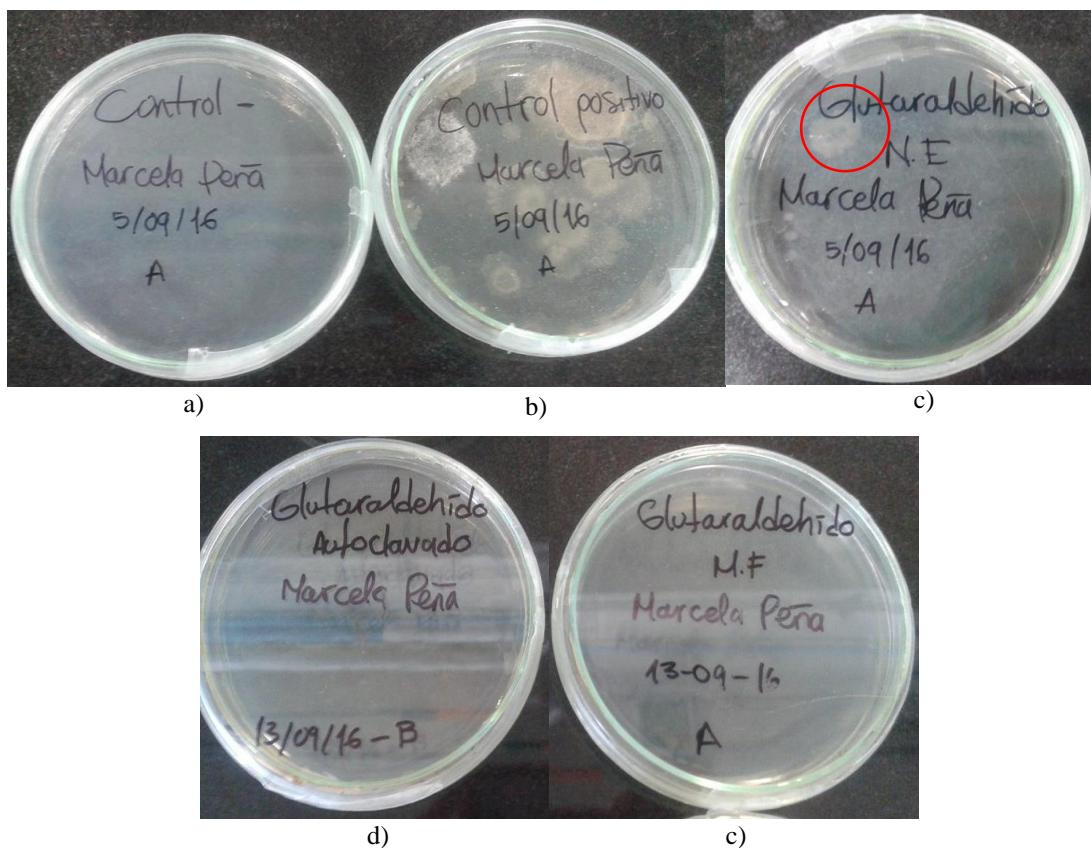


Figura 2. Resultados de las pruebas microbiológicas. A) Control negativo; b) Control positivo; c) Glutaraldehído no estéril (N.E); d) Glutaraldehído autoclavado; e) Glutaraldehído microfiltrado (M.F)

4.2 Estabilidad de las soluciones formadoras del gel: medición de viscosidad y pH

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos para la viscosidad de las soluciones de quitosano y CHP luego del tiempo de almacenamiento, donde $\mu_{N.E}$ corresponde a la viscosidad de las soluciones no estériles, μ_i a la viscosidad inicial luego del proceso de esterilización y $\mu_{ambiente}$ y $\mu_{refriación}$ a la viscosidad de las soluciones almacenadas a diferentes condiciones luego de dos semanas.

Tabla 4. Viscosidad de las soluciones de quitosano y CHP;

Solución	$\mu_{N.E}$ (cP)	Almacenamiento		
		μ_i (cP)	$\mu_{ambiente}$ (cP)	$\mu_{refrigeración}$ (cP)
Quitosano	14400	1138 ± 0.16	433,2 ± 0.26	883,2 ± 0.18
CHP	-	34 ± 0.012	58 ± 0.02	45 ± 0.034

Como puede verse en la tabla 4, la viscosidad del quitosano disminuye significativamente luego del periodo de almacenamiento. Esta disminución en la viscosidad se evidencia también con respecto al quitosano no estéril, debido al rompimiento de las cadenas poliméricas que ocurre durante el ciclo de autoclavado [9]. La disminución de la viscosidad en el tiempo puede deberse a un aumento en la solubilidad del quitosano en solución, como se ha mostrado en estudios previos [6]. Es posible que esta disminución de la viscosidad en el tiempo afecte de manera negativa en la consistencia del gel y las propiedades reológicas del mismo.

En cuanto a la solución CHP, existe una diferencia significativa entre los valores de viscosidad luego del tiempo de almacenamiento y el valor de esta propiedad de la solución no almacenada ($P_{value}=0.004 < \alpha=0.05$). Esto puede deberse a la separación de fases que se ocurre en la solución luego de que esta ha sido preparada. Debido a que la solución se agitó manualmente concluido el tiempo de almacenamiento, en lugar de agitarla nuevamente con la batidora utilizada durante su preparación, es posible que se haya obtenido una solución no del todo homogénea, lo cual explica el aumento de la viscosidad de la solución luego del tiempo de almacenamiento.

Por otro lado, con respecto al glutaraldehído, los resultados obtenidos para la viscosidad de esta solución se muestran a continuación:

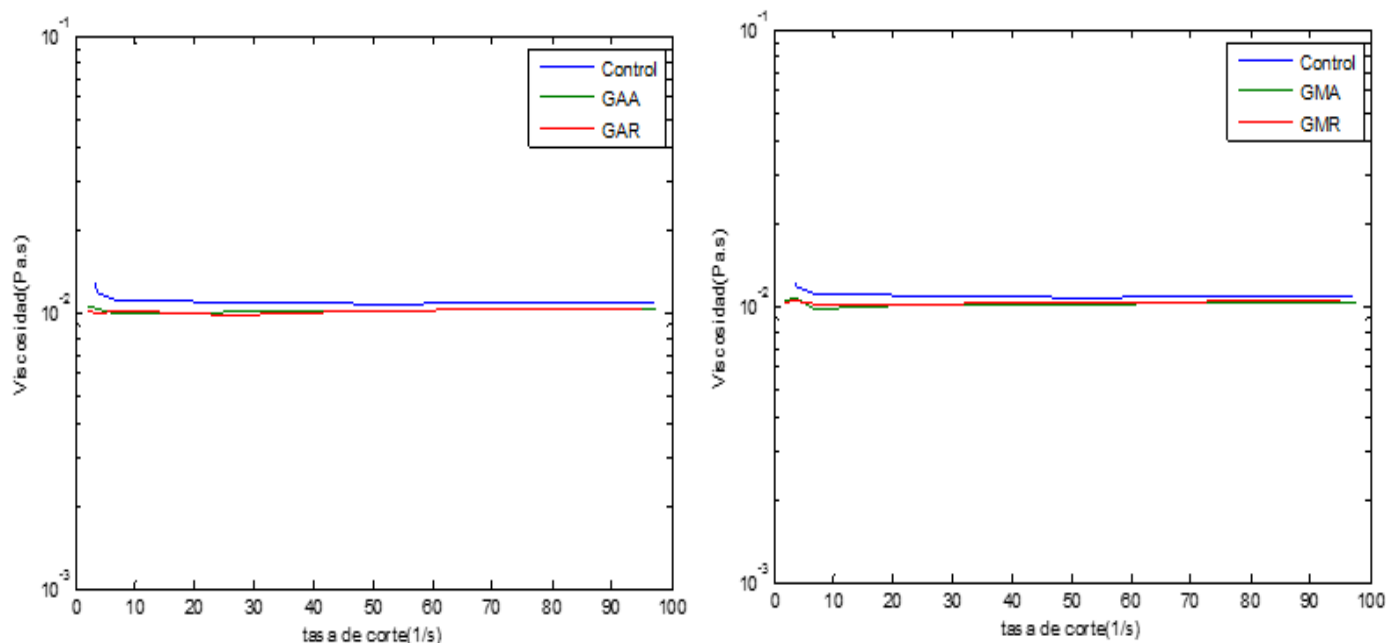


Figura 3. Viscosidad del glutaraldehído (25% v/v) autoclavado (izquierda) y del glutaraldehído microfiltrado (derecha). GAA: *Glutaraldehído autoclavado, almacenado a temperatura ambiente*; GAR: *Glutaraldehído microfiltrado, almacenado a temperatura de refrigeración*. GMA: *Glutaraldehído microfiltrado, almacenado a temperatura ambiente*; GMR: *Glutaraldehído microfiltrado, almacenado a temperatura de refrigeración*.

En la figura 3 puede observarse que no hay una diferencia significativa entre los valores de viscosidad de esta solución para las diferentes condiciones de almacenamiento. Se observa una ligera diferencia entre la viscosidad inicial y las viscosidades luego de dos semanas para el glutaraldehído autoclavado, lo cual puede deberse al cambio en la estructura del glutaraldehído en la solución autoclavada. Por lo anterior, se puede afirmar que la viscosidad del glutaraldehído permanece estable luego de dos semanas.

Por otra parte, en la tabla 5 se puede observar el valor de pH para cada una de las soluciones luego de dos semanas:

Tabla 5. pH de las soluciones formadoras luego de dos semanas

Solución	Almacenamiento		
	pH_i	$pH_{ambiente}$	$pH_{refrigeración}$
Quitosano	4,57	4,63 ± 0.04	4,6 ± 0.015
CHP	6,08	6,22 ± 0.02	6,03 ± 0.015
Glutaraldehído autoclavado	3,2	3,42 ± 0.06	3,4 ± 0.08
Glutaraldehído microfiltrado	3,2	3,23 ± 0.03	3,22 ± 0.02

En cuanto al quitosano, no hay una diferencia significativa entre el pH de la solución almacenada a temperatura ambiente y la solución refrigerada ($Pvalue=0.319 > \alpha=0.05$). Sin embargo, sí hay diferencia entre el pH inicial de la solución y el pH de la solución refrigerada ($Pvalue=0.048 < \alpha=0.05$). Esto puede deberse a cambios en la solubilidad del quitosano a las condiciones de temperatura de almacenamiento. Por otra parte, existe una diferencia significativa entre el pH inicial de la solución CHP y los valores de pH luego de que la solución ha sido almacenada ($Pvalue$ entre 0.001 y 0.015). Esto puede deberse a la separación de fases mencionada anteriormente.

Finalmente, existe una diferencia significativa entre los valores de pH inicial para el glutaraldehído autoclavado con respecto los valores de pH para la solución almacenada a temperatura ambiente y a temperatura de refrigeración ($Pvalue$ 0.027 y 0.041, respectivamente). Sin embargo, no hay diferencia significativa entre los valores de pH a distintas temperaturas de almacenamiento ($Pvalue=0.875$). Esto parece indicar que este método de esterilización influye en el pH de la solución en el tiempo. En contraste, se encontró que no hay diferencia significativa entre el pH inicial del glutaraldehído microfiltrado y los valores de pH luego de dos semanas. Asimismo, no hay diferencia significativa entre los valores de pH a distintas temperaturas de almacenamiento ($Pvalue=0.884$).

4.3 Condiciones de almacenamiento: caracterización reológica

A continuación se muestra el comportamiento del módulo elástico para los geles A, B, C y D:

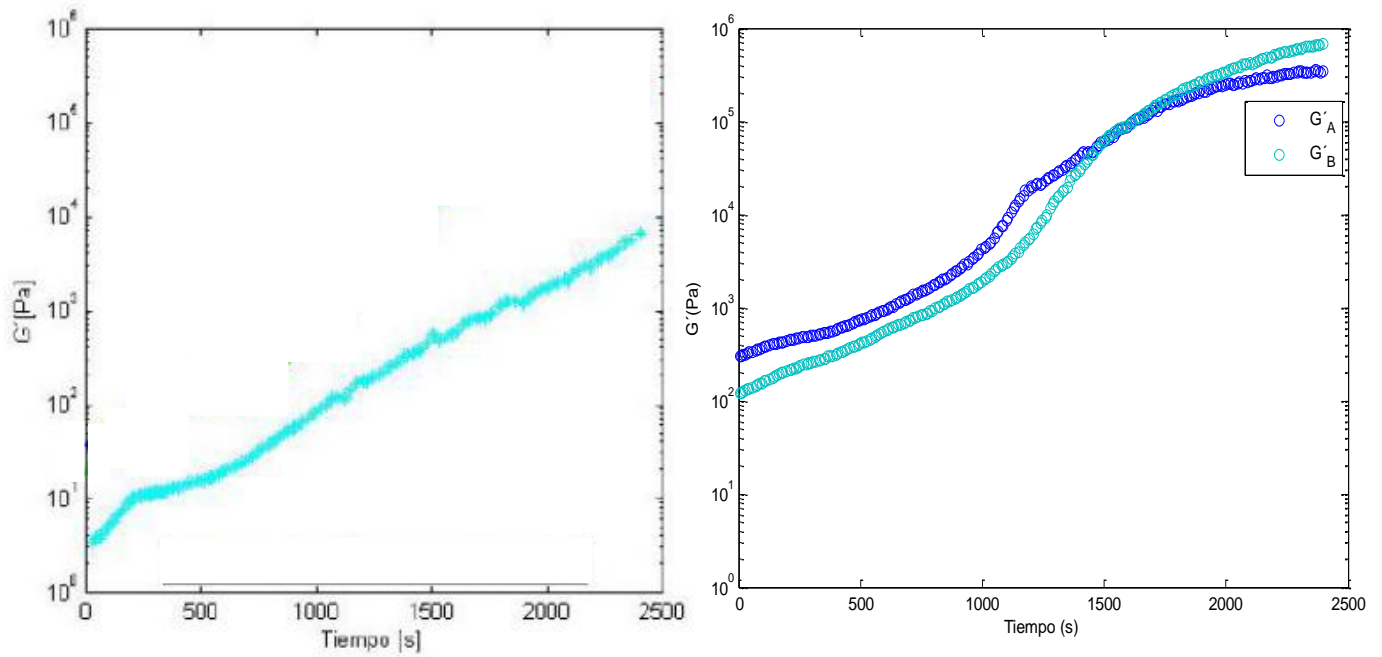


Figura 4. Módulo elástico (G') para el gel control preparado con soluciones autoclavadas (tomado de [12]) (izquierda) y los gels A y B (derecha).

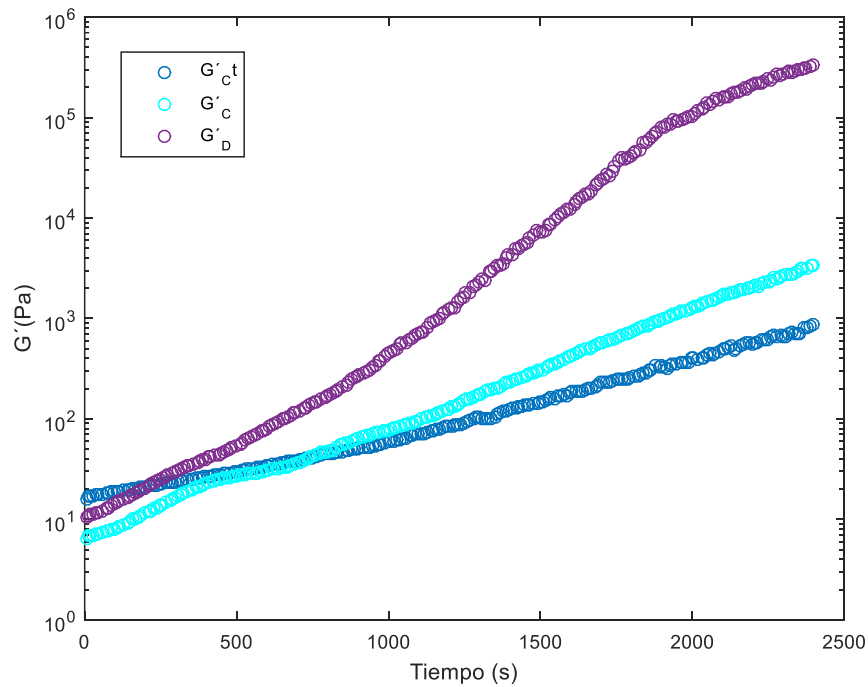


Figura 5. Módulo elástico (G') para el gel control con glutaraldehído microfiltrado (G'_{ct}) y los gels C y D.

Tabla 6. Módulo G' promedio en $t_f=2400$ s

Gel	Módulo G' (Pa)
Control autoclavado	1×10^4
Control microfiltrado	861.1
Gel A	$1.7 \times 10^5 \pm 0.25$
Gel B	$4.19 \times 10^5 \pm 0.15$
Gel C	$1.76 \times 10^4 \pm 0.3$
Gel D	$3.09 \times 10^5 \pm 0.2$

Como puede verse en las figuras 4 y 5, el valor del módulo elástico obtenido para los geles B y D, es superior al valor obtenido de este módulo para los geles A y C. Adicionalmente, en la tabla 6, se puede observar que el módulo elástico promedio de los geles preparados con glutaraldehído microfiltrado es menor que para los geles preparados con entrecruzante autoclavado, al final de cada prueba de reología. Es posible que esta disminución se deba a la diferencia en la estructura que tiene el glutaraldehído en la solución autoclavada con respecto a la estructura en la solución microfiltrada. Asimismo, se puede observar que el almacenamiento de las soluciones aumenta el módulo elástico de todos los geles.

Por otro lado, los geles A y B tienen una apariencia gelatinosa y son más difíciles de esparcir que los geles C y D, los cuales fluyen con mayor facilidad. Lo anterior puede observarse en el valor inicial del módulo elástico para los geles A y B, el cual es un orden de magnitud mayor con respecto al valor inicial del módulo para los geles C y D. Esto pudo evidenciarse durante la preparación de los geles en el laboratorio. Lo anterior indica que la disminución en la viscosidad del quitosano tiene un efecto negativo sobre la consistencia y la aplicación del gel, como se mencionó anteriormente. Adicionalmente, se determinó el tiempo de gelificación promedio para cada uno de los geles. Los resultados se muestran a continuación:

Tabla 7. Tiempo de gelificación para los geles caracterizados

Gel	Tiempo de gelificación (min)
Control autoclavado	16
Control microfiltrado	39,1
Gel A	$29,84 \pm 0.15$
Gel B	$15,11 \pm 0.033$
Gel C	$8,81 \pm 0.18$
Gel D	$15,74 \pm 0.04$

De acuerdo a la tabla 7, el tiempo de gelificación del gel C es menor con respecto a los geles A, B y D. A pesar de esto es deseable, el módulo elástico de este gel es el de menor valor, lo cual lo hace un adhesivo blando y con tendencia a desplazarse luego de la adhesión [24], por lo que el hueso unido con este gel se despegaría fácilmente. Por otra parte, los geles B y D tienen un menor tiempo de gelificación con respecto al gel A. El alto tiempo de gelificación del gel A indica que es posible que la disminución de la viscosidad del quitosano tenga un efecto negativo sobre las propiedades reológicas de los geles. Teniendo en cuenta que los valores de G' para los geles B y D son mayores con respecto a los geles A y C, se puede afirmar que la temperatura de refrigeración tiene un efecto más favorable sobre la reología del gel que la temperatura ambiente.

5. Conclusiones

La microfiltración es efectiva como método para la esterilización de glutaraldehído y representa una mejor alternativa con respecto al autoclavado, puesto que se disminuye significativamente el tiempo de esterilización y no causa cambios en la estructura del glutaraldehído en solución. Sin embargo, teniendo en cuenta que los módulos elásticos de los geles preparados con glutaraldehído microfiltrado son menores con respecto a los módulos de los geles autoclavados, este método no es viable para el protocolo de esterilización de las soluciones formadoras del gel. Teniendo en cuenta que es posible que la disminución de la viscosidad de la solución de quitosano tenga un efecto negativo sobre la consistencia y la reología del gel, se sugiere que se estudien otras alternativas de esterilización para esta solución. Es posible que la microfiltración no sea viable para esterilizar esta solución, puesto que para soluciones muy viscosas de quitosano, los poros del filtro pueden obstruirse [9]. Una posible alternativa es el proceso de esterilización con óxido de etileno, el cual es utilizado para material médico y productos utilizados en la industria farmacéutica [9]. Se ha encontrado que este método no afecta de manera significativa la estructura ni las propiedades fisicoquímicas de membranas de quitosano usadas para tratar heridas [25].

Por otra parte, se concluye que la temperatura más adecuada para almacenar las soluciones es la temperatura de refrigeración (4°C) debido a que los geles preparados con estas soluciones presentaron módulos elásticos más altos y tiempos de gel más cercanos al tiempo de gel reportado en estudios anteriores [5] [12], comparados con los geles preparados con soluciones almacenadas a temperatura ambiente. Adicionalmente, la variación de la viscosidad y el pH de las soluciones fue menor para las soluciones almacenadas a temperatura de refrigeración. Sin embargo, sin importar las condiciones de almacenamiento, el tiempo de gelificación aumentó para la mayoría de los geles con respecto al tiempo de gelificación reportado para geles preparados con quitosano no estéril (13 minutos) [5]. Esto puede deberse a la degradación de la solución de quitosano luego de ser sometida al ciclo de autoclavado, la cual continúa en el tiempo. Se recomienda hacer un seguimiento continuo de este cambio en la viscosidad a las temperaturas de almacenamiento trabajadas, con el fin de entender mejor este fenómeno.

Bibliografía

- [1] M. G. Cortés Rojas, B. Díaz Vallejo y J. E. Perilla, «Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico,» *Revista Ingeniería e Investigación*, vol. 28, nº 1, pp. 57-71, 2008.
- [2] University of Maryland Medical Center , «Tratamiento de fracturas de huesos,» 5 Febrero 2009. [En línea]. Available: <http://umm.edu/health/medical/spanishency/presentations/tratamiento-de-fracturas-de-huesos-serie>. [Último acceso: 18 Abril 2016].
- [3] F. Salcedo Galán, «Evaluación a nivel preclínico de un adhesivo para huesos con potencial uso en el tratamiento de fracturas complejas,» Universidad de los Andes, Bogotá, 2015.
- [4] F. Salcedo y P. Sarmiento, «Análisis de los efectos de la esterilización por autoclave en las propiedades fisicoquímicas de soluciones y geles de quitosano con uso potencial como adhesivo para huesos,» Universidad de los Andes, Bogotá, 2015.

- [5] L. Pinzón y F. T. D. Salcedo, «Análisis reológico de un biocompuesto de quitosano/hidroxiapatita/carbonato de calcio que puede ser utilizado para adhesión ósea,» Universidad de los Andes, Bogotá, 2014.
- [6] L. Pinzón González y F. Salcedo, «Desarrollo y caracterización física, química y mecánica de un compuesto a base de quitosano con potencial uso como adhesivo óseo,» Universidad de los Andes, Bogotá, 2016.
- [7] F. Cedano, «Development and Characterization of a Water-resistant and Biocompatible Adhesive with Potential Use in Bone Fractures,» Universidad de los Andes, Bogotá, 2014.
- [8] F. Croisier y C. Jérôme, «Chitosan-based biomaterials for tissue engineering,» 23 Junio 2013. [En línea]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305712004181>. [Último acceso: 18 Septiembre 2016].
- [9] E. Szymanska y K. Winnicka, «Stability of Chitosan-A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications,» 13 Abril 2015. [En línea]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4413189/>. [Último acceso: 18 Septiembre 2016].
- [10] I. Mingeault, C. Dartiguenave, M. Bertrand y K. Waldron, «Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins and application to enzyme crosslinking,» *Biotechniques*, vol. 37, pp. 790-802, 2004.
- [11] S. Rubbo, J. Gardner y R. Webb, «Biocidal Activities of Glutaraldehyde and Related Compounds,» Abril 1967. [En línea]. Available: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1967.tb00277.x/abstract>. [Último acceso: 18 Septiembre 2016].
- [12] M. C. Pantin Armas, «Diseño de un protocolo de esterilización de geles de quitosano con uso potencial como adhesivo para huesos,» Bogotá, 2016.
- [13] H. C. Vogel y C. M. Todaro, *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook*, William Andrew, 1996.
- [14] N. Starbard, *Beverage Industry Microfiltration*, John Wiley & Sons, 2009.
- [15] S. Ebnesajjad, *Handbook of Adhesives and Surface Preparation: Technology, Applications and Manufacturing*, William Andrew, 2010.
- [16] S. Supper, A. N. J. Boisclair, N. Seidel, M. Riemenschnitter, C. Curdy y T. Vandamme, «Chitosan7glucose 1-phosphate as New Stable in situ Forming Depot System for Controlled Drug Delivery,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 88, nº 2, pp. 73-361, 2014.
- [17] S. Despond, E. Espuche y A. Domard, «Water Sorption and Permeation in Chitosan Films: Relation Between Gas Permeability and Relative Humidity,» *Journal of Polymer Science*, vol. 39, pp. 3114-3127, 2001.

- [18] J. Viljoen, J. Steenekamp, A. Marais y A. Kotzé, «Effect of Moisture Content, Temperature, and Exposure Time on the Physical Stability of Chitosan Powder and Tablets,» *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 40, n° 6, pp. 42-730, 2014.
- [19] A. Toffey, G. Samaranayake y C. G. W. Fraizer, «Chitosan Derivatives: Kinetics of the Heat-Induced Conversion of Chitosan to Chitin,» *Journal of Applied Polymer Science*, 1996.
- [20] A. San Juan, A. Montembault, D. Gillet, J. Say, S. Rouif, T. Bouet, I. Royaud y L. David, «Degradation of chitosan-based materials after different sterilization treatments,» *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, vol. 31, pp. 1-5, 2012.
- [21] Dow, «Glutaraldehyde: Safe Handling and Storage Guide,» 2003. [En línea]. Available: http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_0049/0901b803800490aef?filepath=biocides/pdfs/noreg/253-01338.pdf&fromPage=GetDoc. [Último acceso: 18 Septiembre 2016].
- [22] Z. Okulus y K. V. A. Heberger, «Sorption, Solubility, and Mass Changes of Hydroxyapatite-containing Composites in Artificial Saliva, Food Simulating Solutions, Tea and Coffee,» 31 Agosto 2013. [En línea]. Available: <http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.uniandes.edu.co:8080/doi/10.1002/app.39856/full>. [Último acceso: 18 Septiembre 2016].
- [23] P. Painter y M. Coleman, *Essentials of Polymer Science and Engineering*, Destech Publications, 2009.
- [24] I. Benedek, *Development and Manufacture of Pressure-Sensitive Products*, CRC Press, 1998.
- [25] P. Marreco, P. Da Luz Moreira, S. Genari y A. Moraes, «Effects of Different Sterilization Methods on the Morphology, Mechanical Properties and Cytotoxicity of Chitosan Membranes Used as Wound Dressings,» 15 Noviembre 2004. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15455369/>. [Último acceso: 2016].
- [26] Universidad de los Andes, «Adhesivos, geles, adhesivo óseo: Lista de necesidades/especificaciones de un adhesivo óseo,» Universidad de los Andes, Bogotá.
- [27] Soluciones medioambientales S.L., «Tecnología de membranas: Depuración de aguas residuales industriales,» [En línea]. Available: <http://depuradorasaguasresiduales.es/tecnologia-de-membranas/>. [Último acceso: 18 Septiembre 2016].
- [28] R. Rasente, J. Imperiale, J. Lázaro-Martínez, L. Gualco, R. Oberkersch, A. Sosnik y G. Calabrese, «Dermatan sulfate/chitosan polyelectrolyte complex with potential application in the treatment and diagnosis of vascular disease,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 144, pp. 362-370, 2016.

- [29] D. Chen, H. Yu, H. Mu, J. Wei, Z. Song, H. Shi, R. Liang, K. Sun y L. Wanhui, «Novel chitosan derivative for temperature and ultrasound dual-sensitive liposomal microbubble gel,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 94, n° 1, pp. 17-23, 2013.
- [30] Adhesives and Sealants Industry, «Pressure Sensitive Adhesive Testing,» 11 Septiembre 2000. [En línea]. Available: <http://www.adhesivesmag.com/articles/83570-pressure-sensitive-adhesive-testing>. [Último acceso: 2 Mayo 2016].
- [31] B. Broughton y M. Gower, «Measurement Good Practice Guide No. 47: Preparation and Testing of Adhesive Joints,» Septiembre 2001. [En línea]. Available: <http://www.adhesivestoolkit.com/Docu-Data/NPLDocuments/P%20A%20J/Good%20Practice%20Guides/NPL%20MGPG%20No%2047%20Adhesive%20Joint%20Testing.pdf>. [Último acceso: 1 Mayo 2016].