

BIOGEL DE QUITOSANO A PARTIR DE LA DESACETILACIÓN TERMOALCALINA DE CONCHAS DE CAMARÓN PROPUESTA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ESTOMATITIS SUBPROTÉSICA

Dubraska Suárez* • Carlos García** • Gladys Velazco*** • Reynaldo Ortiz**** • Anajulia González***

*Cátedra de Investigación Social. Departamento de Investigación. **Centro de Investigaciones Odontológicas. ***Laboratorio Integrado de Biología Molecular y Celular (LIBCEM). Facultad de Odontología. ****Laboratorio de Electroquímica Fundamental y Aplicada. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. E-mail: dubraskitasuarez@gmail.com

RESUMEN

La Odontología se ha orientado a la elaboración de propuestas para producir nuevos biomateriales, con el fin de prevenir y tratar enfermedades bucales catalogadas como problemas de salud pública aún no erradicados. La estomatitis subprotésica (ESP) es uno de ellos y la problemática derivada de su tratamiento conlleva a plantearse nuevas terapias a partir de biomateriales como el quitosano, biopolímero derivado de la quitina con propiedades para disminuir la adhesión de *Candida albicans* a las bases de las prótesis totales, y con capacidad para regenerar tejidos. El objetivo de esta investigación fue la elaboración de un gel de quitosano como propuesta terapéutica para la ESP, aplicando una metodología diferente –más simplificada para la obtención del hidrogel– que consistió en obtener quitosano por desacetilación termoalcalina de exoesqueletos de camarones y su posterior transformación en gel vía templado ácido en medio acuoso. El resultado fue un gel de color turbio, que fisicoquímicamente es un biopolímero útil para su posible aplicación como acondicionador de los tejidos en pacientes con ESP. Además, este proceso representa una alternativa tecnológica para el tratamiento de los desechos del camarón, porque se reduce la contaminación ambiental generada por su disposición y se obtiene quitosano de amplia aplicación en otras áreas.

Palabras clave: estomatitis subprotésica, biomateriales, exoesqueletos de camarón, quitosano, geles, desacetilación termoalcalina

BIOGEL OF CHITOSAN SINCE THE THERMOALKALINE DESACETYLATION OF THE SHRIMP SHELLS AS A PROPOSAL FOR THE SUBPROSTHETIC STOMATITIS TREATMENT

ABSTRACT

Dentistry has been oriented to the production of new biomaterials, in order to prevent and treat oral pathologies classified as public health problems that are not yet eradicated. The subprosthetic stomatitis (SP) is considered as one of these cases and the problematic derived from its treatment, implies to think in new therapies since biomaterials as chitosan, a biopolymer, by-product of chitin, with antimycotic properties that reduce the adhesion of *Candida albicans* to the

total prosthesis bases, and being able to regenerate severely damaged tissues. The aim of this study was the elaboration of a chitosan gel as a therapeutic alternative for SP treatment. Thus, a different methodology was studied – more simplified than the procedure to obtain hydrogel – that lies in chitosan extraction by thermoalkaline desacetylation from the shrimp's exoskeleton and lately, and its subsequent transformation into a gel by tempering in an aqueous solution. The result was a turbid gel, whose physicochemical properties have made it a useful biopolymer as a tissue conditioner in patients with SP. So, this process represents a technological alternative for the treatment of shrimp wastes, because it reduces the environmental pollution due to its disposition and produces chitosan that have a wide application in different areas.

Key words: subprosthetic stomatitis, biomaterials, shrimp's exoskeleton, chitosan, gel, thermoalkaline desacetylation

Introducción

La estomatitis subprotésica (ESP) se ha convertido en un problema de salud bucal pública, ya que la inmunidad del paciente se ve afectada debido a las limitaciones relacionadas a la adhesión, permanencia del material en la base protésica y la quimioresistencia a los tratamientos habitualmente empleados para tratar dicha afección, en los que se utilizan antimicóticos, desinfectantes como clorhexidina, compuestos derivados del fenol como Listerine® e hipoclorito de sodio, o se incorporan drogas antimicóticas a los acondicionadores de tejido (1).

Ante esta problemática, se han desarrollado biomateriales con base en componentes netamente naturales y de sistemas biológicamente activos. Este es el caso del quitosano, poco conocido en la ciencia odontológica aun cuando algunos estudios (2) refieren que este biopolímero es altamente útil para combatir entes patógenos y lesiones inflamatorias y úlceras en cavidad bucal. Es considerado como un biomaterial de bajo costo y de origen natural; es

un polímero hidrofílico obtenido de la desacetilación de la quitina y se ha comprobado que tiene excelentes propiedades biomédicas y antibióticas, por consiguiente, se aplica en diversas áreas, principalmente en medicina (3). Este biopolímero se ha utilizado como membrana de hemodiálisis, sutura biodegradable, sustituyente artificial de la piel, agente cicatrizante en quemaduras, sistema liberador de fármacos, para la liberación de insulina, transporte de agentes anticancerígenos, tratamiento de tumores (leucemia), control del virus del SIDA, entre otros usos en el área médica.

Por otra parte, se ha reportado la utilidad del quitosano en el desarrollo de sistemas mucoadhesivos para la liberación controlada de fármacos (nifedipina, propranolol e insulina) a nivel de la mucosa gástrica y bucal (4). Además, se ha demostrado la capacidad del quitosano para favorecer el paso de macromoléculas hidrofílicas a través de un modelo de mucosa bucal (cultivos celulares TR 146) a concentra-

ciones a las cuales el polímero resultó ser no citotóxico. Por todo lo anterior, se concluye que este polímero tiene un futuro prometedor en el desarrollo de sistemas mucoadhesivos destinados a la liberación de moléculas activas a nivel de las mucosas gástrica y bucal (4).

Existe un sistema para elaborar geles de quitosano mezclados con gluconato de clorhexidina al 0.01 y 0.02%, aislando la *Porphiromona gingivalis* y evaluando la capacidad bactericida del mencionado sistema. Se observó claramente que la adhesividad del quitosano a la superficie gingival de los animales de experimentación fue bastante alta, y se potenció altamente la acción de la clorhexidina acompañada del quitosano (5).

En consecuencia, existe evidencia científica que indica que el quitosano es biocompatible, biodegradable y no tóxico, por sí mismo posee actividad antimicrobiana y antifúngica (2,6). En Venezuela, y específicamente en Mérida, no existen antecedentes de estudios que reporten la aplicación del quitosano en Odontología. En vista del poco conocimiento que se tiene de esta sustancia, cabe destacar que es probable que sea uno de los polímeros más compatible que hasta ahora se conoce. Partiendo de estas consideraciones, el objeto de esta propuesta investigativa consistió en formular un gel con base en quitosano, para su posible aplicación en el tratamiento de la ESP.

Materiales y métodos

Esta investigación de tipo transversal y diseño experimental, comprendió los siguientes procesos de laboratorio: desmineralización, desproteínización, desacetilación (tratamiento químico de la materia prima), purificación y filtrado, polimerización y prueba del gel. El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera:

Selección de la materia prima: 1 kg de camarones *Pleuoncodes planipes*, a los que se extrajo los exoesqueletos que luego se sometieron a la limpieza en el Laboratorio de Polímeros de la Universidad de Los Andes de Mérida, utilizando cepillos de cabezal corto número 2 y una solución no jabonosa con base en O₂ y sin cloro (Vanish®) para evitar contaminaciones de la materia prima (Figura 1).

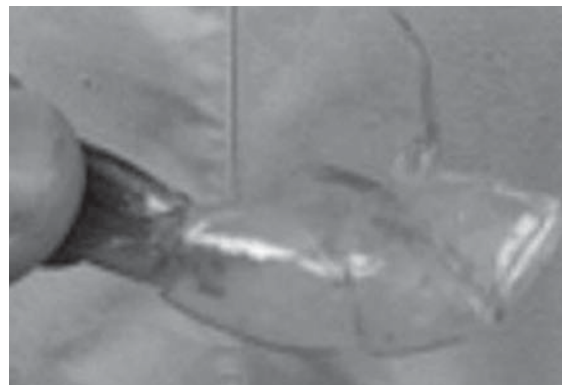


Figura 1. Exoesqueleto de camarón

Posterior al lavado, los exoesqueletos se transportaron en una bandeja envuelta en papel de aluminio para someterse a un secado continuo por 24 horas en una estufa marca GCA/Precisión Scientific, Modelo 2 a 100°C; posteriormente los exoesqueletos debieron ser molidos y tamizados en un molino Tomas Witley Mill modelo ED5 (Figura 2).



Figura 2. Polvo de exoesqueletos de camarones

Obtenido el polvo de los exoesqueletos, se procedió a un pesaje de la materia prima en una balanza electrónica marca SCIENTECH ZSA 210 con la finalidad de realizar los cálculos para determinar las concentraciones necesarias.

Tratamiento químico de la materia prima para la obtención de quitina: comenzó con la desmineralización de la materia prima

utilizando HCl a una concentración 1 N. La relación seleccionada en esta experiencia fue 1:5, es decir, por cada gramo de materia prima 5ml de HCl. La relación entonces fue establecida como se observa en la ecuación 1, correspondiente al cálculo para la desmineralización de la materia prima en relación al peso:

$$\text{Des} = \sim 63 \text{ gr} \times 5 \text{ ml HCl} = 315 \text{ ml HCl}$$

En un balón de 400 ml se colocó la materia prima y se procedió a agregar los 315 ml HCl, a su vez, el balón se colocó en una plancha a 37°C para ser sometido a una agitación constante durante cuatro horas como se observa en la Figura 3.

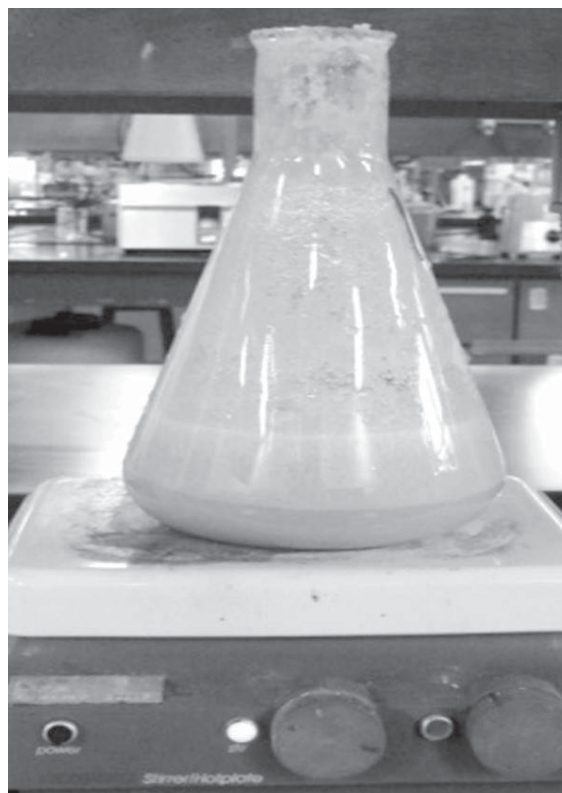


Figura 3. Desmineralización de la materia prima

Cuatro horas después se realizó el lavado de la muestra en una centrífuga a cien revoluciones por minuto (100rpm) y con agua ultra pura durante tres sesiones para eliminar completamente el HCl remanente y evitar pérdida de materia prima, sólo eliminando el sobrenadante como se observa en la Figura 4.



Figura 4. Lavado y centrifugado para la obtención de quitina

El pH en este momento es ácido, por lo que se modificó hasta la neutralidad utilizando NaOH al 50% concentrado, goteándose y midiéndose progresivamente con un pH metro. Los exoesqueletos sometidos al procedimiento descrito pasan a ser quitina biopolímero tipo polisacárido, considerado a menudo como un derivado de la celulosa, la diferencia se encuentra en el grupo hidroxilo del carbono 2, el cual en la quitina ha sido sustituido por el grupo acetamida y cuyo monómero es: 2-Acetamido-2-deoxi-β-D-glucosa; caracterizándose por ser blanca, dura e inelástica. La obtención de quitosano se realiza por medio de un tratamiento con álcali concentrado y caliente, con el fin de retirar la mayor cantidad de unidades aceto de la estructura del polímero (Figura 5).



Figura 5. Tratamiento termoalcalino y desacetilación de la quitina

La desacetilización de la quitina se realizó en un balón de 500 ml desde el sedimento hasta su aforo con NaOH al 27%, por 24 horas, a una temperatura de 30°C. El polímero resultante es básico debido al grupo amino libre en su estructura, lo cual le proporciona ciertas características químico-físicas de gran interés médico y odontológico. El producto se purificó por filtrado en un embudo Buchner, realizando lavados con agua destilada, hasta lograr eliminar la alcalinidad del medio.

Con la finalidad de determinar la calidad del quitosano y potencialidad para convertirse en un hidrogel, se procedió a preparar las muestras de quitosano por disolución en una mezcla compuesta de ácido acético 0,1 M y cloruro de sodio 0,2 M con agitación constante. En este procedimiento se pudo observar la disolución paulatina del quitosano y su paso a gel (Figura 6).



Figura 6. Biogel de quitosano

Resultados y discusión

Se obtuvieron dos biopolímeros intermedios, la quitina, producto de la desacetilación primaria de la materia prima (polvo de exoesqueletos), y el quitosano, resultante de la desacetilación termoalcalina exhaustiva de la quitina.

Algunos investigadores han obtenido quitosano con características similares, mediante desacetilación termoalcalina de la quitina con hidróxido de sodio al 50% a 100°C (7); mientras que en el presente estudio se realizó con hidróxido de sodio al 27%, por 24 horas, a 30°C, disminuyendo la alcalinidad en el medio para facilitar la purificación del producto y reducción de los costos e insumos, así como una reducción del riesgo laboral en el trabajo de laboratorio. Sin embargo, existen quienes difieren del proceso prefiriendo realizar la desacetilación NaOH al 70% a 105°C (8).

El producto final consistió en un gel, con pH neutro, de color turbio (amarillento), con atributos similares al gel esperado y caracterizado previamente por otros investigadores. El mencionado color amarillento puede deberse a trazas de elementos proteínicos constituyentes del exoesqueleto de los camarones en su proceso de descalcificación y desproteínización, ya que no se utilizaron solventes como el xileno para la decoloración de las conchas por ser una sustancia fuerte, y para no utilizar concentraciones mayores de álcali en el medio. En este sentido, este estudio difiere del procedimiento usado por otros investigadores empleando xileno en concentraciones no reportadas, para decolorar el polvo de los exoesqueletos de camarones (8). Ahora bien, en este particular, este estudio coincide con la desproteínización y desmineralización del polvo de materia prima molida y la posterior desacetilación de la quitina sin pasar por la decoloración (7).

El proceso planteado en esta investigación también difiere de otros estudios, ya que el lavado se realizó en una centrífuga con el fin de eliminar el sobrenadante (desecho), evitar la pérdida exagerada de materia prima, conferirle una mayor especificidad y sensibilidad a este método y reducir el porcentaje de error en los productos obtenidos; en este sentido, se recomienda lavar con agua destilada y recoger las impurezas con papel filtro (7).

Finalmente, las concentraciones de los reactivos químicos, temperaturas y tiempo de reacción empleadas en esta investigación, difieren de los resultados reportados (6,7,8,9), debido a que la muestra de exoesqueletos de camarones, fue diferente en cuanto a especie del crustáceo, peso y cantidad de materia prima, y tiempo de unión del exoesqueleto al cuerpo del camarón mucho mayor que el obtenido en las camaroneras como desecho inmediato.

Conclusiones

Se elaboró un gel de quitosano a partir del exoesqueleto del camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) como propuesta terapéutica a la ESP, de grado técnico, purificado con propiedades para ser utilizado como probable biomaterial. El protocolo de obtención del gel para este estudio es diferente a otros, ya que su finalidad radicó en obtener el quitosano para aplicar en cavidad bucal y con un procedimiento más corto y sencillo de realizar, experiencia que se puede repetir en posteriores estudios en el área odontológica.

De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible inferir que las características físico-químicas del gel del quitosano dependerán del proceso de purificación al cual sea sometido y del protocolo adoptado, así como también de la finalidad a la que se destine su procesamiento. El método de dilución parcial e hinchamiento en ácido acético permitió la identificación de gel de quitosano acorde con los valores reportados que en esta investigación es turbio (amarillento), pigmentación que puede responder a trazas de elementos proteínicos constituyentes del exoesqueleto de los camarones en su proceso de descalcificación y desproteínización.

Una formulación en forma de gel de quitosano, limitará el problema de la solubilidad y permitirá la liberación controlada de fármacos, o de sus componentes intrínsecos regeneradores de queratocitos, fibroblastos, y estimulador de otras células mediadores de la inflamación, así como su acción antibiótica, biocompatibilidad y escasa citotoxicidad, perfilan a este hidrogel como el candidato de elección para el tratamiento de la ESP y de otras patologías inflamatorias en Odontología, y una serie de potenciales usos, que, sin duda alguna, simplificarían el tratamiento del paciente odontológico.

Referencias

- 1 Pardi G, Cardozo E. Mecanismos de Defensa del Hospedero en Estomatitis Sub - Protésica Inducida por Candida. Rev. Acta Odontológica Venezolana. 2002; (40):297-300.
- 2 Azcurra A, Barembaum S, Bojanich M. Efecto del quitosano de alto peso molecular y del alginato de sodio, sobre la hidrofobicidad y adhesión de *Cándida albicans* a células. Ciencias UANL. 2002; 5(1).
- 3 Lárez VC. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. Revista Iberoamericana de Polímeros. 2003; 4(2).
- 4 Portero A. Desarrollo de nuevos sistemas mucoadhesivos de quitosano para la liberación específica de moléculas activas a través de las mucosas gástrica y bucal. Universidad Santiago de Compostela. 2001.
- 5 Ikinci G, Senel S., Akincibay H. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. International Journal of Pharmaceutics; 2002. [actualizado 2006 julio 17]. Disponible en: <http://www.elsevier.com/locate/ijpharm>
- 6 Dhanikula A. B, Panchagnula R. Konstantklimat über waessrigen Loseungen. Deutsches Institut für Normung. The AAPS Journal. 2004; 6(3), artículo 27.
- 7 Mármol Z, Gutiérrez E, Páez G, Ferrer J, Rincón M. Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón; diciembre 2004; 4(2), p.p. 91-95 [actualizado 2008 marzo 4]. Disponible en: http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S131722552004012000003&lng=es&nrm=iso. ISSN 1317-2255
- 8 Lemus J, Martínez L, Navarro M, Posadas A. Obtención y uso de quitosano para tratamientos dérmicos a partir de exoesqueleto de camarón. Facultad de Ingeniería, Universidad Rafael Landívar. Boletín Electrónico; 2007; 07. [actualizado 2008 febrero 22]. Disponible en: http://ingenieria.url.edu.gt/boletin/URL_07_QUI01.pdf
- 9 Katime O, Katime D. Los materiales inteligentes de este milenio: Los hidrogeles macromoleculares. Servicio editorial de la Universidad del País Vasco. Bilbao; 2004.