

MATERIALES Y METODOS.

Obtención de la Materia Prima

El aislamiento de quitina y quitosano a partir de la cáscara de camarón, así como su aplicación lleva consigo una serie de pasos que van desde la obtención de la materia prima hasta la aplicación de la quitina aislada.

La obtención de la materia prima abarcó las siguientes etapas:

Recolección de la Materia Prima.

La cáscara utilizada en el presente trabajo fue proporcionada por la planta congeladora "Asociación Unidad Industrial Pesquera Sur de Sonora" de Guaymas, Sonora. Las cáscaras pertenecen al camarón del género Penaeus y se almacenaron a -15 C antes de ser procesadas.

Procesamiento de la Materia Prima.

Las cáscaras se colocaron en una marmita de acero inoxidable con agua a 80° C durante 30 minutos. Posteriormente se colocaron en charolas para secarlos en un secador de túnel Proctor y Schwartz (modelo K16978) durante 18 horas y a una temperatura de 70° C. Las cáscaras se molieron en un molino de martillos Whiley (modelo 4). Posteriormente se les empacó al vacío utilizando una empacadora SUPERVAC y una bolsa de cloruro de polivinilideno (PVC).

Aislamiento de Quitina

El aislamiento de quitina requiere de dos pasos fundamentales que son: Desproteínización y Desmineralización (Figura 5).

Desproteínización

A la cáscara seca, se le extrajo la proteína utilizando una solución de NaOH de concentración variable durante 60 minutos. Se utilizaron lotes de 140 gr. de cáscara, misma que se mezcló repetidamente con la solución de NaOH utilizando un agitador magnético. La temperatura de la mezcla fue controlada a 60°C. Este paso permite separar el complejo proteína-quitina. El tiempo de reacción se mantuvo constante (60 mins), y posteriormente se realizó una filtración utilizando un cedazo quesero comercial para separar el residuo del sobrenadante.

Este paso se realizó primero debido a que si no se va a seguir de inmediato con el paso de desmineralización, se puede almacenar el extracto sin que sufra descomposición, debido a la presencia NaOH (Johnson y Peniston, 1982). Otros autores sugieren desmineralizar antes de desproteínizar (Ashford, 1977).

Cuantificación de la Proteína

El sobrenadante obtenido en el paso de desproteínización se centrifugó a 2000 rpm, en una centrifuga CRV (modelo 5000), durante 10 minutos.

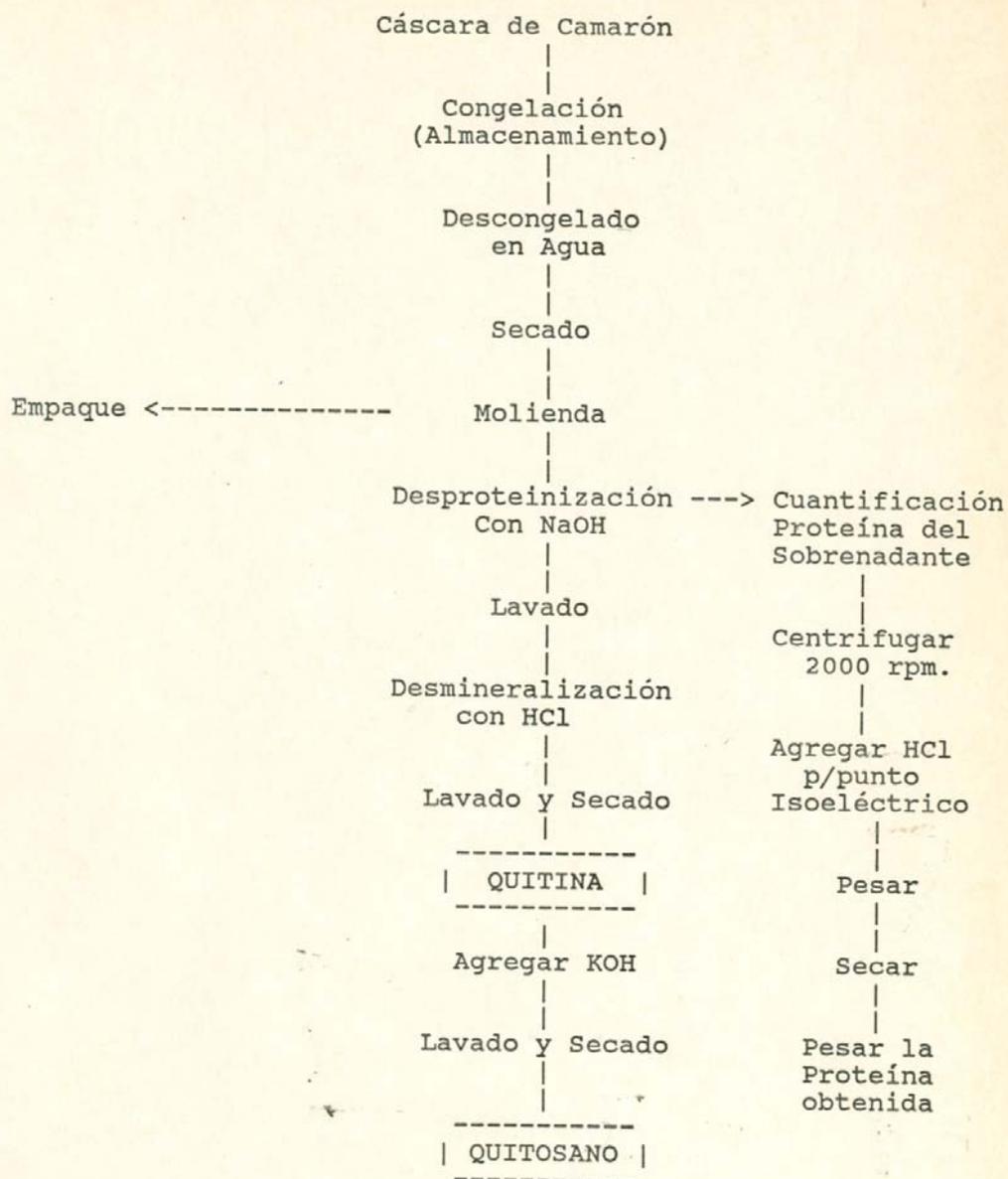


Figura 5: Diagrama de Flujo para la Extracción de Quitina y Quitosano a Partir de Cáscara de Camarón.

Posteriormente se lavó, y se centrifugó de nuevo a la misma velocidad y por el mismo tiempo. Al sedimento se le agregó HCl hasta que la proteína llegara a su punto isoelectrico. Una vez que precipitó la proteína, ésta se volvió a lavar, se pesó y se secó en una estufa de vacío (Modelo VWR 1430) durante 6 horas a una temperatura 45-50°C. Una vez seca se pesó en una balanza analítica, y de esta manera se cuantificó la proteína.

Desmineralización.

Para remover la materia mineral presente el sedimento que se obtuvo durante la desproteínización, fue lavado con agua destilada hasta eliminar el hidróxido de sodio (pH=7.5 - 8.0). Posteriormente se le agregó ácido clorhídrico a concentraciones diferentes y se le sometió a un tratamiento térmico por 120 minutos. Posteriormente se realizó un lavado extensivo hasta eliminar el ácido, para lo cual se uso una tela como filtro. La muestra se secó en una estufa de convección VWR (mod. 1430) a 50° C por 18 hrs, obteniéndose así a la quitina para su caracterización y estudio posterior.

Variables y Condiciones Experimentales

Durante el aislamiento de quitina se controlaron las variables que determinan la desproteínización y desmineralización, así como la eficiencia de estos dos pasos.

En la desproteínización las concentraciones de NaOH que se utilizaron para la experimentación fueron 2% y 0.4%.

El tratamiento térmico y el tiempo permanecieron constantes (60°C y 60 minutos respectivamente), así como la relación Soluta-Solvente que fué de 1:7.

En el paso de desmineralización las concentraciones de HCl que se utilizaron para la experimentación fueron de 3% y 5%. Por lo que respecta al tratamiento térmico en este paso, se utilizaron las siguientes temperaturas: 40°C, 50°C y 60°C, permaneciendo constante el tiempo que fue 120 minutos y la relación soluto-solvente 1:7.

Se realizaron 12 corridas experimentales por duplicado en las que se combinaron cada uno de los niveles de cada variable o factor estudiado. De esta forma fue posible obtener 12 tipos de productos de diferentes características. En todas las muestras obtenidas se llevaron a cabo determinaciones de quitina y cenizas. Además se pudo calcular el rendimiento de quitina para cada corrida de acuerdo a la relación:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Quitina Obtenida (g)}}{\text{Quitina disponible en Muestra original (g)}} \times 100$$

Donde:

Quitina Obtenida = (g Quitina B.S.) (% Quitina determinada)

Quitina disponible en muestra original = g de cáscara x 0.39.

Con estos tres criterios fue posible establecer cuales de las condiciones empleadas, permiten obtener la(s) quitina(s), con las mejores características de pureza y rendimiento global del proceso.

De acuerdo a las concentraciones utilizadas y las condiciones en que se realizó el proceso, se escogieron las quitinas que observaron mejor rendimiento así como las que presentaron mayor pureza de acuerdo a la determinación de quitina por el Método de Black and Schwartz (1950) (Anexo 3). Estas quitinas se utilizaron como agentes de cicatrización de úlceras de etiología varicosas, y postflebitica vía aplicación tópica directa del polvo esterilizado (120 ° C -15 min.). Además las quitinas se utilizaron también para preparar quitosano.

Caracterización de Quitina

Durante el proceso de desmineralización se obtuvieron 12 diferentes quitinas, de las cuales se escogieron 3 por presentar las características requeridas en cuanto a pureza, rendimiento y cenizas. Dichas muestras, fueron caracterizadas en cuanto al contenido de humedad, nitrógeno, impurezas, viscosidad y pruebas de solubilidad.

Nitrógeno

Se determinó nitrógeno total por el método Kjeldhal de A.O.A.C. (1980). Para conocer la cantidad de nitrógeno que no está asociado a la proteína, se hizo una corrección de

nitrógeno utilizando para ello la técnica recomendada por Meyers et al., 1973 (Anexo 4).

Viscosidad

Para determinar la viscosidad se prepararon soluciones acidificadas de quitosano a diferentes concentraciones. Se obtuvo la viscosidad puntual en la velocidad adecuada, se determinó la viscosidad de 5 soluciones acidificadas de quitosano en diferentes concentraciones. Se utilizó un viscosímetro rotacional marca Brookfield (Mod. LVTD), con velocidades de rotor adecuadas para generar lecturas confiables, y una aguja de cilindro de 7.9 cm de longitud efectiva y 0.9421 cm de radio. Las lecturas se tomaron a 22°C.

Humedad

Se utilizó el método de secado en estufa de vacío (100°C= 23 pulg.vac) (AOAC, 1980).

Impurezas

Se determinaron en función del contenido de Cenizas a 900 °C por un período de 6 horas, según lo recomienda Muzzarelli (1983).

Prueba de Solubilidad

Se prepararon soluciones de ac. acético, fórmico, y mezcla de diclorometano y ácido tricloroacético en diferentes concentraciones.

Se evaluó el grado de solubilidad de 1 g de muestra en 100 ml de solución.

Formación de Películas.

Se formaron películas a partir de las 3 mejores quitinas, disolviendo un gramo de quitina en 100 ml. de una mezcla de ácido tricloroacético y diclorometano, en una proporción 1:2.33 (V/V). Se agitó en una licuadora por 5 minutos y posteriormente se siguió la metodología de Averbach (1978) para lo cual se depositó una capa de solución sobre una superficie plana que permitió su aplicación. Se efectuó un lavado con NaOH al 1% para neutralizar, y una vez neutralizada se lavó con agua destilada para posteriormente secarse en una estufa de convección VWR a una temperatura de 40-45°C. El objeto de secar las películas fué el de determinar sus características en base a su composición química, es decir nitrógeno, humedad, cenizas y quitina, según la metodología descrita anteriormente.

Preparación de Quitosano

Las quitinas aisladas fueron sometidas al siguiente proceso para obtener los correspondientes quitosanos.

Se agregó una solución del 50% de KOH a la quitina a una temperatura de 110°C. Se mantuvo reflujo durante 70 minutos, para posteriormente ser lavada, y después secada a 50°C en una estufa de convección por 18 hrs.

Los quitosanos obtenidos fueron analizados en cuanto a humedad, impurezas, solubilidad, nitrógeno y viscosidad, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

Aplicación de Quitina

Una vez aislada y caracterizada la quitina se molió en un molino de martillos hasta que se obtuvo un polvo con tamaño promedio de partícula de 70-100 micras. Este polvo se esterilizó en una autoclave a 121°C y 15 psi durante 20 minutos para obtener un material libre de microorganismos. El polvo se empacó en bolsas de plástico estériles, para evitar contaminaciones antes de ser aplicado sobre las heridas de los pacientes seleccionados para el estudio. La aplicación fue por vía tópica directa en dosis de 0.5 gr a 1 gr. debido a que el tamaño de la úlcera fué variable. Para determinar el contenido de microorganismos presentes en el polvo se le efectuó una cuenta total tanto al polvo estéril como sin esterilizar, siguiendo la metodología oficial descrita en el Manual Bacteriológico de la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, 1980). Para ésto se utilizó Agar para Métodos Estándar y Recuento en Profundidad, la incubación fué a 37°C ± 1 durante 24 y 48 hrs. y de esta manera se tuvo la certeza que no causaría efectos secundarios de contaminación al ser aplicada.

Grupos Experimentales

Se seleccionaron 2 grupos de pacientes con úlceras de etiología venosa conocida, procedentes de la consulta externa de Angiología de la clínica del IMSS del Hospital General de Zona 2 de Hermosillo, - Sonora. El grupo I se formó de 4 pacientes con úlceras varicosas y el grupo II de 4 pacientes con úlceras posflebíticas en sus extremidades inferiores. Además, se seleccionaron dos pacientes como control para cada grupo experimental. Estas pacientes presentaron también úlceras varicosas (Control Grupo I) y posflebíticas (Control Grupo II) y fueron tratadas con la terapéutica tradicional. Es decir, en el caso del control (Grupo I) las úlceras se trataron con agua y jabón, mientras que el control del Grupo II se trató con aplicaciones tópicas de Recoverón. Este es un producto comercial a base de copolímeros hidrolizados provenientes de polisacáridos cuyo uso se recomienda en este tipo de enfermedades. El Recoverón está considerado como un constituyente del tejido conjuntivo, estimula la producción de fibroblastos en forma armónica y teóricamente acelera la limpieza de la herida evitando vicios y retardos en la cicatrización. Sin embargo, es importante notar aquí que el producto presenta serias desventajas tales como la inducción de fuertes irritaciones en la zona afectada, contenido de azúcar y alto costo.

Los pacientes podían ser de cualquier sexo o edad, debían presentar una o más úlceras de pierna de etiología venosa, tanto postflebíticas como varicosas, sin límite en su tiempo de evolución. El período de tratamiento para todos los pacientes fue de un mes.

Los pacientes fueron evaluados por un médico angiólogo, quién efectuó estudios clínicos y radiológicos cuando así se requirió. También se practicaron pruebas de química sanguínea, general de orina y biometría hemática. Igualmente se tomaron en cuenta en el estudio otras variables que pudieran intervenir en la evolución favorable o desfavorable de la cicatrización de las heridas como son: edad, sexo, enfermedades asociadas, actividad cotidiana, tratamientos utilizados, cirugías previas, paridad, hábito tabáquico, tiempo de evolución, otros medicamentos utilizados durante el estudio, estado de nutrición, tamaño inicial de la úlcera y edema circunferencial inicial. Este último se consideró como la diferencia de diámetro de las extremidades medidas a nivel de la úlcera y utilizando como referencia fija los maleolos tibial y peroneo.

En la consulta inicial para incluir a cada paciente en el estudio se llenó una hoja de captación de datos. Así mismo se evaluó la úlcera considerando su extensión total. Para medir la úlcera se llevó a cabo el siguiente procedimiento: 1. Se impregnaron sus bordes con colorante azul de metileno. 2. Se aplicó una hoja de papel "copia"

sobre la úlcera, de tal manera que quedó una "imprenta" de su perímetro real. 3. Esta "imprenta" se calcó sobre papel milimétrico, con lo que se pudo cuantificar con facilidad el área de la úlcera en milímetros cuadrados, (Arteaga, 1987). Así mismo se tomó un cultivo para bacterias y hongos, y, por medio de tiras reactivas Bili-Labatix (Laboratorio Miles), se determinó el ph, glucosa, sangre y proteínas presentes en la heridas. Esta evaluación se repitió cada semana.

Todos los pacientes fueron instruídos cuidadosamente en cuanto a la aplicación del medicamento, misma que se realizó topicamente sobre toda la extensión de la úlcera después de haber realizado el lavado diario recomendado por el medico con agua hervida y jabón en su domicilio. El medicamento se conservó sobre la úlcera cubriendo ésta con gasas estériles sostenidas por una venda elástica.

Diseño Experimental

Aislamiento de Quitina

Se utilizó un diseño factorial 2x2x3, con 3 factores 2, 2 y 3 niveles por factor y 2 repeticiones por celda, de acuerdo al modelo.

$$Y_{ijkl} = \mu + J_i + \beta_j + \gamma_u + (J\beta)_{ij} + (\tau_r)_{ik} + (\beta_r)_{jk} + (J\beta_r)_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

$$i = 1,2$$

$$j = 1,2$$

$$K = 1,2,2$$

$$l = 1,2$$

Donde los factores fueron:

- (A) Concentración de HCl (%): 3 y 5
- (B) Concentración de NaOH (%): 0.4 y 2
- (C) Temperatura de proceso (°C) 40, 50 y 60

Con este diseño se obtuvieron tres interacciones dobles AxB, AxC y BxC y una interacción triple AxBxC.

Este diseño se aplicó con el objeto de establecer las mejores condiciones de extracción. Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza adecuado para el arreglo factorial (Box G.E., 1978).

Cicatrización de Heridas

Para el estudio de cicatrización se utilizó un diseño basado en un análisis de frecuencias. Se construyeron tablas de contingencia de clasificación cruzada 2x2 para probar la asociación entre las variables: Uso de quitina y recuperación. Para probar la independencia entre las variables se utilizó la hipótesis nula.

$$H_0: P_{i/j} = P_i$$

Donde:

P_i = probabilidad marginal por filas

Inicialmente se pensó en utilizar una prueba de Chi-cuadrado con un 95% de confiabilidad (Sumers G.W. 1981). Sin embargo, Everitt (1977), recomienda que cuando la frecuencia esperada en alguna de las celdas sean menor a 5 en tablas de clasificación 2 x 2 debe utilizarse una prueba exacta de Fisher en vez de la de Chi cuadrada. En este caso se siguió esta prueba alternativa, mediante la cual se obtuvo la probabilidad de que efectivamente existía una asociación de variables. Para poder rechazar la hipótesis nula esta igualdad debía dejar de cumplirse al menos en algunas de las celdas.