

**OBTENCIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO A PARTIR DEL MICELIO DE
ASPERGILLUS NÍGER PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE
FÁRMACOS**

GUSTAVO ADOLFO MUÑOZ RUIZ

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS-QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI
2012**

**OBTENCIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO A PARTIR DEL MICELIO DE
ASPERGILLUS NÍGER PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE
FÁRMACOS**

GUSTAVO ADOLFO MUÑOZ RUIZ

Director:

Fabio Zuluaga Ph.D.

Departamento de Química

Grupo de investigación SIMERQO-POLÍMEROS

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS-QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI
2012**

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS-QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI
2012

GUSTAVO ADOLFO MUÑOZ RUIZ

OBTENCIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO A PARTIR DEL MICELIO DE
***ASPERGILLUS NÍGER* PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE**
FÁRMACOS

TEMAS:

Quitosano

Micelio

Aspergillus niger

Hidrogeles

Liberación controlada de fármacos

Betahistina

Estudios de biocompatibilidad *in vivo*

*Este trabajo está dedicado a mi madre María Helena Ruiz y a la memoria de mi Padre Walter
Armando Muñoz por todo su apoyo incondicional y sabios consejos.*

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Al profesor Fabio Zuluaga por haberme brindado la oportunidad de hacer parte de su grupo de investigación, como también por sus valiosas sugerencias a nivel académico, profesional y personal.
- ❖ A los profesores del Departamento de Química por todas sus contribuciones en mi formación académica.
- ❖ Al personal de la Universidad en especial a Luís Eduardo Hurtado, Carlos Rodríguez, José Alberto Nieto y Mario Velasco; por haber contribuido de diversas formas durante el desarrollo de este trabajo.
- ❖ A la Universidad del Valle por todos estos años de formación y por el soporte financiero para realizar la maestría.
- ❖ A la Universidad Icesi por facilitar sus instalaciones para realizar los estudios cinéticos de hinchamiento y liberación.
- ❖ A los profesores Nora Valderrutén y Eduardo Ruiz, por todas las recomendaciones brindadas para el desarrollo de este trabajo.
- ❖ A los estudiantes de química farmacéutica de la Universidad Icesi, Giselle Álvarez, Laura Trujillo, Catalina Suarez y Julián De la Cruz, por el apoyo brindado durante los estudios de hinchamiento y liberación.
- ❖ A la empresa Sucromiles S.A. por facilitar materias primas y reactivos, en especial a los ingenieros Gonzalo Gnecco y Orlando Castaño.
- ❖ Al odontólogo Carlos Valencia y el bioquímico Oscar Tamayo por el apoyo brindado para los estudios *in vivo*.
- ❖ A mis compañeros del grupo SIMERQO-Polímeros, en especial a Elkin Romero, Diana Díaz y Carlos Grande por las discusiones originadas alrededor del tema central de este trabajo (el quitosano).
- ❖ A Loren Nieto por su apoyo incondicional incluso en los momentos más difíciles. Gracias también por las valiosas sugerencias aportadas a este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	5
2.1 Los biopolímeros.....	5
2.2 Quitina	6
2.2.1 Aplicaciones de la quitina.....	9
2.2.2 El hongo <i>Aspergillus niger</i> como fuente de quitina.....	12
2.3 El quitosano	15
2.3.1 Aplicaciones del quitosano.....	18
2.4 Caracterización del quitosano.....	22
2.5 Biocompatibilidad y biodegradabilidad del quitosano	22
2.6 Hidrogeles.....	23
2.6.1 Características de los hidrogeles	27
2.6.2 Aplicaciones de los hidrogeles	32
2.7 Sistemas de liberación controlada	35
2.7.1 Sistemas controlados por difusión.....	35
2.7.2 Sistemas controlados por vía química.....	38
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
3.1 Extracción quitosano.....	40
3.2 Obtención de hidrogeles de quitosano	41
4. JUSTIFICACIÓN.....	43
5. OBJETIVOS.....	45
5.1 Objetivo General	45
5.2 Objetivos Específicos.....	45
6. METODOLOGÍA.....	46
6.1 Equipos.....	46
6.2 Reactivos	46
6.3 Estimación de la cantidad de quitina presente en el micelio de <i>Aspergillus niger</i>	46
6.4 Extracción de quitosano de micelio del hongo <i>Aspergillus niger</i>	47
6.4.1 Diseño experimental	47
6.4.2 Influencia del tratamiento ácido en la extracción	48
6.4.3 Extracción de quitosano con las mejores condiciones encontradas	49
6.4.4 Extracción de quitosano en planta piloto	49
6.5 Caracterización del quitosano extraído	50
6.5.1 Caracterización espectroscópica	50
6.5.2 Grado de desacetilación del quitosano	50
6.5.3 Determinación del peso molecular	51
6.5.4 Análisis térmico.....	51
6.5.5 Difracción de rayos X.....	51
6.6 Síntesis de hidrogeles de quitosano.....	51
6.6.1 Entrecruzamiento con dialdehídos	52

6.6.2 Entrecruzamiento con ácidos dicarboxílicos.....	53
6.7 Caracterización de los hidrogeles de quitosano	53
6.7.1 Caracterización espectroscópica	53
6.7.2 Micrografía electrónica de barrido	53
6.7.3 Análisis térmico.....	54
6.8 Cinética de hinchamiento de los hidrogeles	54
6.9 Cinética de liberación <i>in vitro</i> de un fármaco modelo	55
6.9.1 Incorporación del fármaco en el hidrogel	55
6.9.2 Estudios cinéticos de liberación	55
6.10 Ensayos de degradación hidrolítica.....	56
6.11 Estudios de biocompatibilidad <i>in vivo</i>	56
6.11.1 Procedimiento pre-quirúrgico	56
6.11.2 Procedimiento quirúrgico	57
6.11.3 Eutanasia y recuperación de las muestras.....	58
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	59
7.1 Estimación de la cantidad de quitina presente en el micelio de <i>Aspergillus niger</i>	59
7.2 Optimización de la extracción de quitosano	61
7.3 Caracterización del quitosano.....	66
7.3.1 Espectroscopía infrarroja	66
7.3.2 Resonancia magnética nuclear	68
7.3.3 Determinación del grado de desacetilación.....	70
7.3.4 Peso molecular promedio viscoso.....	72
7.3.5 Análisis térmico.....	74
7.3.6 Difracción de rayos X.....	77
7.4 Extracción de quitosano en planta piloto.....	78
7.5 Síntesis de hidrogeles de quitosano.....	80
7.5.1 Entrecruzamiento con dialdehídos	80
7.5.2 Entrecruzamiento con ácidos dicarboxílicos.....	83
7.6 Caracterización de los hidrogeles de quitosano	86
7.7 Estudios de hinchamiento de los hidrogeles de quitosano	91
7.7.1 Estudio cinético del hinchamiento	96
7.8 Cinética de liberación <i>in vitro</i> de un fármaco modelo	101
7.9 Estudio de degradación hidrolítica	104
7.10 Estudios de biocompatibilidad <i>in vivo</i>	106
8. CONCLUSIONES	110
9. PERSPECTIVAS	113
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación de las hifas durante su crecimiento masivo para la generación de micelio.	13
Figura 2. Representación de la pared celular del hongo <i>Aspergillus niger</i>	14
Figura 3. Modelo representativo de un hidrogel.	24
Figura 4. Estado contraído e hinchado en los que se puede encontrar un hidrogel debido a la transición de fase.	28
Figura 5. Sistema de liberación controlada con núcleo interno.	36
Figura 6. Dispositivo monolítico para la liberación controlada.	37
Figura 7. Sistema de liberación controlada por hinchamiento.	38
Figura 8. Sistema de liberación bioerosionable.	38
Figura 9. Sistema de liberación de cadenas laterales.	39
Figura 10. Curvas de concentración del principio activo en plasma vs. tiempo para un intervalo terapéutico estrecho. (A) y (B) sistemas convencionales para la entrega de fármacos, (C) sistema de liberación controlada.	42
Figura 11. Diagrama de flujo del proceso de extracción de quitosano a partir de hongos.	47
Figura 12. Dispositivo empleado para la síntesis de los hidrogeles.	52
Figura 13. Implantación de hidrogeles en el modelo animal. (A) Preparación del campo quirúrgico, (B) disección de la epidermis, (C) inserción del material polimérico y (D) sutura de la incisión.	58
Figura 14. Complejo quitina-glucano aislado del hongo <i>Aspergillus niger</i>	60
Figura 15. Espectro RMN- ¹⁵ N CP-MAS del complejo quitina-glucano.	61
Figura 16. Resultados del diseño experimental empleado.	64
Figura 17. Influencia del ácido en el proceso de extracción de quitosano.	65
Figura 18. Diagrama de bloques para el proceso de obtención de quitosano.	66
Figura 19. Espectro FTIR del quitosano extraído y el comercial.	67
Figura 20. Espectro ¹ H-RMN del quitosano extraído en DMSO-d ₆ y CF ₃ COOH a 25 °C.	68
Figura 21. Espectro RMN- ¹³ C CP-MAS para el quitosano extraído.	69
Figura 22. Espectro RMN- ¹⁵ N CP-MAS para (A) quitosano extraído y (B) complejo quitina-glucano.	70
Figura 23. Valoración potenciométrica del quitosano para determinar el grado de desacetilación.	71
Figura 24. Viscosidad reducida de las soluciones de quitosano extraído con HCl a 70 °C en función de la concentración.	72
Figura 25. Viscosidad reducida de las soluciones de quitosano extraído con HCl a 25 °C en función de la concentración.	73
Figura 26. TGA obtenido para una muestra de quitosano extraído.	75
Figura 27. TGA obtenido para una muestra de quitosano comercial.	75
Figura 28. DSC obtenido para una muestra de quitosano extraído.	76
Figura 29. Difractogramas del quitosano extraído (—) y de una muestra comercial (—).	78
Figura 30. Planta piloto para la extracción de quitosano.	78

Figura 31. Hidrogeles de quitosano entrecruzados con dialdehídos luego de ser cortados.....	81
Figura 32. Hidrogeles de quitosano entrecruzados con ácido glutárico luego de ser cortados con el sacabocados.....	84
Figura 33. Espectro IR de una de las muestras de hidrogel obtenida con quitosano extraído.....	87
Figura 34. Microscopía electrónica de barrido para: (A) micelio, (B) quitosano extraído, (C) hidrogel con un 50% de entrecruzamiento y (D) hidrogel con un 100% de entrecruzamiento.	88
Figura 35. Análisis termogravimétrico (TGA) para el hidrogel obtenido con glutaraldehído al 100%.	89
Figura 36. Análisis termogravimétrico (TGA) para el hidrogel obtenido con ácido glutárico al 100%.	90
Figura 37. Grado de hinchamiento (W) en función del tiempo de los hidrogeles obtenidos con glutaraldehído: (A) 50%, (B) 75%, (C) 100%.....	92
Figura 38. Grados de hinchamiento (W) en el equilibrio para los hidrogeles de quitosano con glutaraldehído a diferentes valores de pH y porcentajes de entrecruzamiento.	93
Figura 39. Contenido de agua (H) en función del tiempo para los hidrogeles de quitosano obtenidos con glutaraldehído: (A) 50%, (B) 75%, (C) 100%.....	94
Figura 40. Cinéticas de primer orden para los hidrogeles de quitosano con glutaraldehído.	98
Figura 41. Cinéticas de segundo orden para los hidrogeles de quitosano con glutaraldehído.	100
Figura 42. Curva de calibración para la betahistina analizada por espectroscopía ultravioleta.	101
Figura 43. Cinética de liberación de betahistina desde los hidrogeles de quitosano.	103
Figura 44. Representación de $\ln(M_t/M_\infty)$ en función de $\ln t$, para la liberación de Betahistina desde los hidrogeles de quitosano en equilibrio de hinchamiento.	104
Figura 45. Pérdida de peso en función del tiempo luego de la degradación hidrolítica de los hidrogeles de quitosano.....	105
Figura 46. Recuperación de las muestras y tejido conectivo circundante. (A) Hidrogel quitosano-glutaraldehído; (B) Hidrogel quitosano-ácido glutárico.....	107
Figura 47. Estudio histológico de las muestras de piel implantada con hidrogeles de quitosano-ácido glutárico.	108

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Estructura química de: (a) quitina y (b) celulosa.....	6
Esquema 2. Configuración polimórfica de la α -quitina, a) modelo estructural, b) modelo con líneas.....	8
Esquema 3. Configuración polimórfica de la β -quitina, a) modelo estructural, b) modelo con líneas.....	9
Esquema 4. Algunas reacciones de o-alkilación de la quitina.	11
Esquema 5. Tosilación de la quitina y copolimerización injerto con poliestireno.	11
Esquema 6. Desacetilación de la quitina para obtener el quitosano.....	16
Esquema 7. Estructuras de algunos colorantes adsorbidos con quitosano en los efluentes de las fábricas de tintes.	19
Esquema 8. Estructura química de la genipina.	26
Esquema 9. Principales interacciones intermoleculares que intervienen en la transición de fase.	28
Esquema 10. Estructura y fórmula molecular del complejo quitina-glucano.	60
Esquema 11. Reacción de desacetilación de la quitina en medio básico.	61
Esquema 12. Protonación y desprotonación del quitosano durante la etapa final de extracción.....	62
Esquema 13. Reacción de entrecruzamiento de las cadenas de quitosano con dialdehídos.....	80
Esquema 14. Mecanismo de reacción para el entrecruzamiento de las cadenas de quitosano con dialdehídos.....	82
Esquema 15. Reacción de entrecruzamiento de las cadenas de quitosano con ácidos dicarboxílicos.	83
Esquema 16. Estructura química de la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.....	84
Esquema 17. Mecanismo de reacción propuesto para el entrecruzamiento de las cadenas de quitosano con los ácidos dicarboxílicos.....	85

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Polisacáridos que conforman la pared celular de algunos hongos.	13
Tabla 2. Métodos de caracterización del quitosano.	22
Tabla 3. Grupos funcionales ionizables a partir de los cuales se pueden obtener hidrogeles sensibles al pH.	31
Tabla 4. Algunos hidrogeles de origen natural y sintético estudiados como sistemas de liberación controlada de fármacos, con sus respectivos principios activos estudiados.....	35
Tabla 5. Ficha técnica del micelio producido por la empresa Sucromiles S.A.	43
Tabla 6. Análisis elemental para tres muestras del complejo quitina-glucano (CQG).....	59
Tabla 7. Diseño experimental factorial para la optimización de la extracción de quitosano.	63
Tabla 8. Desplazamientos químicos del quitosano obtenidos por RMN- ¹³ C CP-MAS.	69
Tabla 9. Análisis elemental de diferentes muestras de quitosano obtenido de <i>Aspergillus niger</i>	71
Tabla 10. Influencia de la temperatura en el tratamiento con HCl al 1% en el peso molecular del quitosano obtenido.	74
Tabla 11. Análisis de costos gruesos para la obtención de 1 kg de quitosano.	79
Tabla 12. Precio del quitosano industrial en diferentes países.	80
Tabla 13. Características que presentaron los hidrogeles obtenidos con dialdehídos a diferentes porcentajes de entrecruzamiento.	83
Tabla 14. Características que presentaron los hidrogeles obtenidos con ácidos dicarboxílicos a diferentes porcentajes de entrecruzamiento.....	86
Tabla 15. Temperaturas de degradación para los diferentes hidrogeles sintetizados.....	90
Tabla 16. Valores de W en el equilibrio de hinchamiento a los diferentes valores de pH y porcentajes de entrecruzamiento.	93
Tabla 17. Valores obtenidos de la regresión lineal para la curva de calibración.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

α	Constante alfa para la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada
CP	Polarización cruzada (por sus siglas en inglés)
CQG	Complejo quitina-glucano
D	Coeficiente de difusión
Da	Dalton
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DD	Grado de desacetilación (por sus siglas en inglés)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (por sus siglas en inglés)
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
GPC	Cromatografía de permeación en gel (por sus siglas en inglés)
h	Hora
h	Espesor del hidrogel
H	Contenido de agua
HEMA	Hidroxietilmetacrilato
IR	Infrarrojo
K	Constante kappa para la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada
K	Constante de Huggins
MAS	Rotación al ángulo mágico (por sus siglas en inglés)
Mv	Peso molecular viscoso
[η]	Viscosidad intrínseca
η_{sp}	Viscosidad específica
NHS	N-hidroxisuccinimida
NIPA	N-isopropilacrilamida
NVP	Poli(N-vinilpirrolidona)
PGA	Ácido poliglicólico (por sus siglas en inglés)
PHEMA	Polihidroxietilmetacrilato
PLA	Ácido poliláctico (por sus siglas en inglés)

ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Microscopia electrónica de barrido (por sus siglas en inglés)
T_g	Temperatura de transición vítrea
TGA	Análisis termogravimétrico (por sus siglas en inglés)
THF	Tetrahidrofurano
ton	Tonelada
UV-VIS	Ultravioleta-visible
W	Grado de hinchamiento
W_d	Pérdida de peso por degradación

RESUMEN

Los biopolímeros son en la actualidad un tema de gran importancia debido a las múltiples aplicaciones que pueden alcanzar, especialmente las de tipo biomédico. Específicamente la quitina y su principal derivado el quitosano, presentan como ventaja adicional una considerable abundancia en la naturaleza, lo cual los ha hecho mucho más atractivos a nivel investigativo. En este trabajo se realizó la extracción de quitosano a partir del hongo *Aspergillus niger*, una fuente alternativa de quitina y quitosano que se encuentra ampliamente disponible en la región, como subproducto industrial de la producción de ácido cítrico. Mediante la optimización del proceso de extracción de quitosano se logró alcanzar rendimientos cercanos al 7%, valor superior a los ya reportados en la literatura, con un proceso químico más sencillo, haciéndolo más atractivo para el sector industrial.

Una vez obtenido el quitosano se realizó una completa caracterización espectroscópica y se determinaron sus principales propiedades como el grado de desacetilación y el peso molecular, que son fundamentales para definir las aplicaciones en las que se puede utilizar el material extraído. El quitosano obtenido presentó un grado de desacetilación del 77.3% mediante potenciometría y 74.5% mediante análisis elemental; el peso molecular viscoso fue de 1.49×10^5 g/mol clasificándose como un quitosano de bajo peso molecular.

Posteriormente las cadenas de quitosano obtenido se entrecruzaron con dialdehídos (glutaraldehído y glioxal) y con ácidos dicarboxílicos (ácido succínico y ácido glutárico), para obtener estructuras tridimensionales conocidas como hidrogeles. Estos materiales son de gran interés ya que son estudiados en la dosificación controlada de principios activos, para mantener constante su concentración durante un tiempo prolongado. Los hidrogeles de quitosano se

caracterizaron mediante espectroscopía infrarroja y presentaron una estabilidad térmica por encima de los 250 °C. Mediante micrografías electrónicas de barrido se pudo observar que estos materiales presentan poros irregulares, polidispersos e interconectados.

Los estudios cinéticos de hinchamiento mostraron que los hidrogeles sintetizados siguen una cinética de hinchamiento de segundo orden. Se observó además que el hinchamiento varía dependiendo del pH; cuando el pH del medio fue ácido, se alcanzó un mayor porcentaje de hinchamiento con respecto al estudio en medio neutro o alcalino. Por otra parte se realizó la liberación de Betahistina desde los hidrogeles hinchados, la cual evidenció un mecanismo de difusión Fickiano, es decir, controlado únicamente por fenómenos de difusión.

Los hidrogeles de quitosano fueron sometidos a degradación hidrolítica bajo condiciones fisiológicas simuladas (pH 7.4 y 37 °C), el estudio mostró una pérdida de peso alrededor del 37% en un periodo de 31 días. Finalmente, se realizó un estudio piloto de biocompatibilidad *in vivo* para los hidrogeles obtenidos, utilizando conejos de raza New Zealand como modelo animal.

1. INTRODUCCIÓN

Durante el proceso industrial para la obtención del ácido cítrico, mediante la fermentación aeróbica de azúcares en presencia del hongo *Aspergillus niger*, la empresa Sucromiles S.A obtiene como coproducto 13500 ton/año de micelio húmedo de este hongo. La pared celular del micelio está constituida por polisacáridos como la quitina, biopolímero lineal formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas a través de enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. La quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa, y mediante procesos de desacetilación se obtiene el quitosano como su principal derivado (Cai *et al.*, 2006). Tanto la quitina como el quitosano han despertado gran interés a nivel investigativo, ya que estos polisacáridos pueden encontrar aplicaciones en la industria farmacéutica, textil, papelera y de alimentos, como también en la agricultura y la medicina (Majeti *et al.*, 2000). Todas estas aplicaciones que se le atribuyen a estos biopolímeros se debe principalmente a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y abundancia en la naturaleza (Domard, 2011).

Tradicionalmente el quitosano se ha obtenido a partir del exoesqueleto de crustáceos mediante un proceso que involucra varias etapas (desmineralización, desproteínización, desacetilación de la quitina y extracción en medio ácido del quitosano) (Abdou *et al.*, 2008; Bajaj *et al.*, 2011). En el presente trabajo se emplea el micelio del hongo *Aspergillus niger* como fuente de quitosano, el cual se logra extraer en un proceso más sencillo que involucra sólo dos etapas: hidrólisis básica y extracción en medio ácido, obteniendo un quitosano de origen no-animal y dándole un valor agregado a este coproducto industrial, esperando así contribuir a largo plazo con el desarrollo socio-económico de la región.

Por otra parte, mediante el entrecruzamiento físico o químico de las cadenas de quitosano se pueden obtener redes tridimensionales conocidas como hidrogeles, los cuales se caracterizan por absorber grandes cantidades de agua o soluciones

acuosas a través de su hinchamiento, conservando su forma original (Shibayama *et al.*, 1993). El hinchamiento o transición de fase de los hidrogeles es una propiedad que puede variar de acuerdo a las condiciones del medio en el que se encuentran, como por ejemplo la temperatura, el pH, la fuerza iónica, entre otras; por esta razón, para describir su capacidad de hinchamiento frente algún estímulo externo, algunos autores les han otorgado el calificativo de polímeros “inteligentes” (Katime, 2000).

Los hidrogeles además son conocidos como sistemas de liberación controlada de diferentes principios activos tanto a nivel intracorpóreo como epidérmico, ya que son capaces de mantener constante la concentración de fármaco en un medio determinado por un intervalo de tiempo prolongado. Esta segunda cualidad junto con la respuesta selectiva al medio, ha motivado la ejecución de diversos estudios enfocados a la liberación controlada y dirigida de medicamentos y nutrientes a sitios específicos del organismo. La liberación de un fármaco al pH específico del tracto gastrointestinal, por ejemplo, evita problemas de tipo farmacocinético y mejora la disponibilidad del medicamento en el organismo (Peppas *et al.*, 2000, Ishihara *et al.*, 2006; Jain *et al.*, 2007).

En este trabajo se obtuvieron hidrogeles de quitosano mediante el entrecruzamiento covalente de sus cadenas con diferentes agentes entrecruzantes, con el fin de obtener materiales compatibles y degradables útiles para la industria farmacéutica. Se presentan además los resultados obtenidos en los diferentes estudios de tipo cinético y de compatibilidad realizados sobre los materiales sintetizados, aportando resultados de interés para la ciencia de los materiales poliméricos.

2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

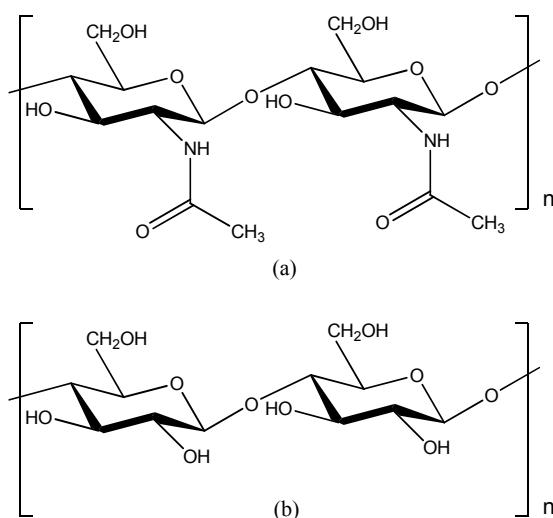
2.1 Los biopolímeros

Los polímeros naturales también llamados biopolímeros, son recursos renovables generados durante el ciclo de vida de plantas, animales, bacterias y hongos. Los biopolímeros se caracterizan por tener estructuras complejas, bajos índices de polidispersidad y fácil degradación (Johnson *et al.*, 2003). Dentro de los principales biopolímeros se encuentran las proteínas, los polinucleótidos, los polihidroxialcanoatos y los polisacáridos, estos últimos conformados por unidades de monosacáridos unidas a través de enlaces glicosídicos. Dentro de las principales limitaciones que presentan los biopolímeros se encuentra su insolubilidad en algunos medios y sus bajas propiedades mecánicas; sin embargo, mediante modificaciones químicas como procesos de funcionalización, copolimerización, entrecruzamiento y formación de compositos, ha sido posible el mejoramiento de sus propiedades fisicoquímicas aumentando así su aplicabilidad. En la actualidad, los biopolímeros se han investigado ampliamente para aplicaciones de embalaje y empaques biodegradables, como también para aplicaciones biomédicas; especialmente para ser utilizados como dispositivos terapéuticos cardiovasculares, ortopédicos, oftalmológicos, dentales, sustitutos de la piel, sistemas de liberación de fármacos y sensores para propósitos de diagnóstico (Johnson *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2009; Siracusa *et al.*, 2008).

Los polisacáridos eran considerados en un principio únicamente como fuente de energía metabólica, sin embargo, a lo largo de su existencia han encontrado múltiples aplicaciones debido a que son materiales no tóxicos, biodegradables y de gran abundancia en la naturaleza. Los polisacáridos se pueden clasificar de acuerdo a su carácter ácido-base, por lo que existen polisacáridos como el glucógeno, la celulosa y el dextrano que tienen un carácter neutro. La pectina, el ácido algínico y el agar son algunos ejemplos de polisacáridos con carácter ácido. Finalmente se encuentran algunos polisacáridos altamente básicos como la quitina y el quitosano.

2.2 Quitina

La quitina es un polisacárido lineal nitrogenado conformado por unidades de 2-acetamida-2-deoxi- β -D-glucopiranosas unidas a través de enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. Este polisacárido presenta una estructura similar a la celulosa; en lugar de tener un grupo hidroxilo en el carbono número 2, presenta el grupo acetamida como se puede ver en el Esquema 1. La quitina fue aislada por primera vez en 1811 por el químico y botánico francés Henri Braconnot, quien encontró en algunos hongos un material resistente a condiciones alcalinas (Khor, 2001); vale la pena resaltar que la quitina fue el primer polisacárido identificado por el hombre seguido por la celulosa que fue descubierta en 1838 por el químico francés Anselme Payen (Zugenmaier, 2008). En 1823 Antoine Odier halló un material con propiedades similares a las descritas por Braconnot mientras estudiaba la cutícula de algunos insectos y lo denominó quitina, nombre proveniente del griego “chiton” que hace referencia a una túnica o envoltura. En 1843 Payen observó la presencia de nitrógeno en la quitina, observación que fue confirmada por Fischer y Leuchs. Posteriormente, Karrer y Zechmeister realizaron experimentos con quitina y encontraron la N-acetilglucosamina como su principal componente (Jeuniaux, 1996). Finalmente, la estructura de la quitina fue confirmada en la primera mitad del siglo XX por Meyer y Pankow mediante estudios de difracción de rayos X (Meyer, 1935).

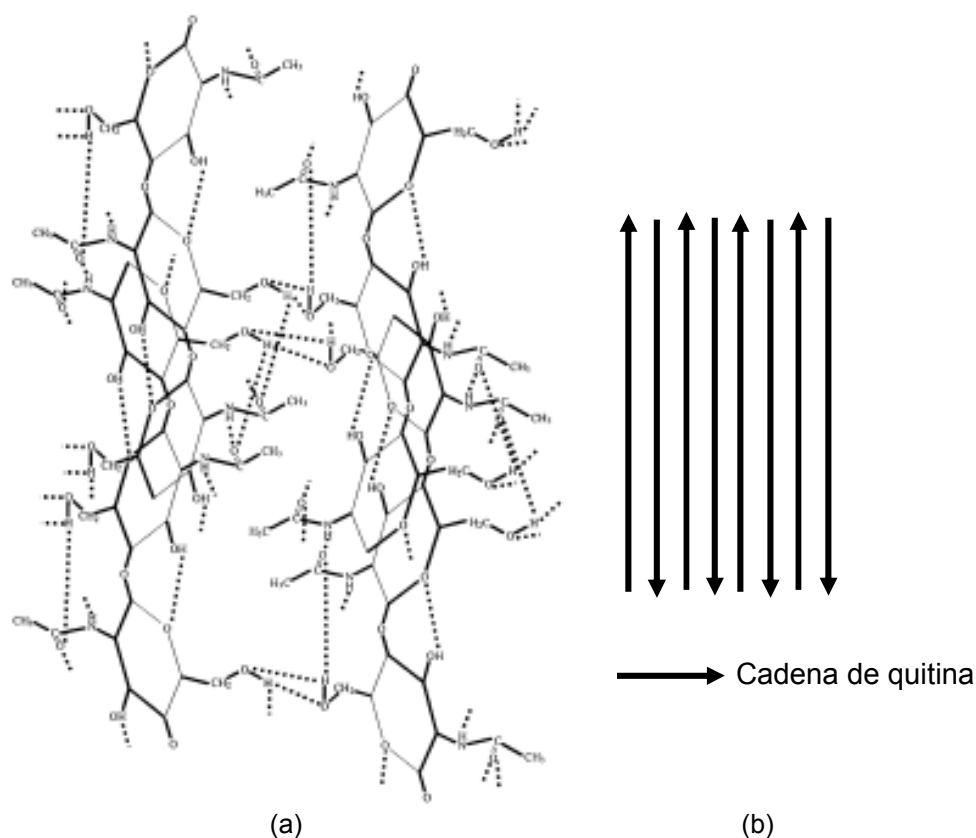


Esquema 1. Estructura química de: (a) quitina y (b) celulosa.

Es importante resaltar que la quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa, ya que se encuentra ampliamente distribuida en hongos, diatomeas, artrópodos y otro gran número de animales y plantas; en la actualidad se estima una producción mundial de 10^{11} ton de quitina por año (Kurita, 2006). A pesar de esta gran disponibilidad en la tierra, la explotación comercial de quitina sólo se ha enfocado en los subproductos derivados de la industria alimenticia marina, como camarones, cangrejos, langostas y calamares (Kim, 2011), cuyos residuos generan un impacto ambiental negativo debido a su persistencia, generación de patógenos que ponen en riesgo la salud humana y el aumento de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) en ríos y océanos. La mayor producción de quitina a partir de estas fuentes marinas se registra en países como la India, Polonia, Japón, China, Estados Unidos, Noruega y Australia (Dutta, 2004).

La quitina presenta pesos moleculares promedios entre 1.03×10^6 y 2.5×10^6 Da y se caracteriza por ser un polisacárido insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos. Ésta se puede solubilizar en soluciones con una fuerza iónica grande como la hexafluoroacetona o el dicloroetano con ácidos minerales, como también en dimetilacetamida con un 5% de cloruro de litio (Majeti *et al.*, 2000). Tamura y colaboradores en el año 2006 solubilizaron la quitina en una solución saturada de cloruro de calcio dihidratado en metanol, tomando como antecedente la solubilidad que presenta el Nylon-6® en esta misma solución (Tamura *et al.*, 2006). La insolubilidad que presenta la quitina está asociada con el alto grado de cristalinidad, debido a la formación de diferentes enlaces de hidrógeno entre el oxígeno del carbonilo del grupo acetamida ya sea con el hidrógeno del grupo hidroxilo secundario ubicado en C-3, con el hidroxilo primario ubicado en C-6 ó con el hidrógeno de otro grupo acetamida, manteniendo fuertemente unidas las cadenas de la quitina. Se reconocen en la actualidad tres formas cristalinas para este polisacárido, las cuales dependen de la fuente de donde se extrae. La α -quitina es la forma más abundante y se halla presente en el caparazón de mariscos y en la pared celular de los hongos. En esta forma cristalina las cadenas

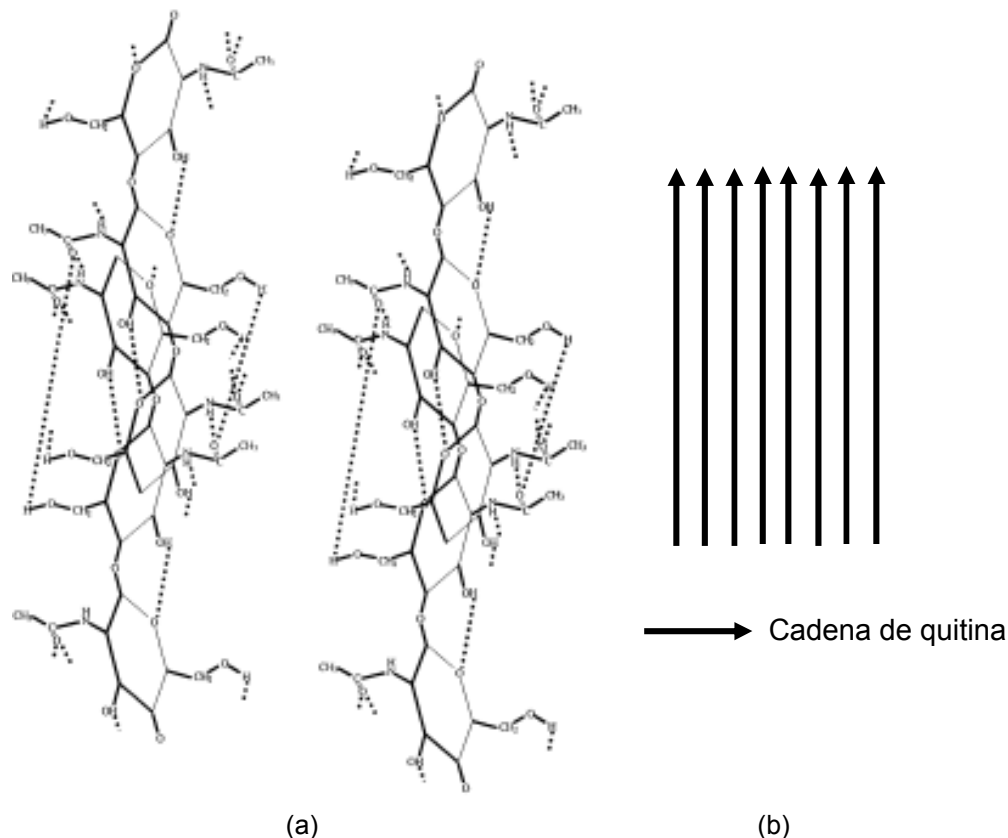
de quitina se encuentran organizadas en una configuración anti-paralela (Esquema 2) como lo hacen las cadenas del Nylon®, lo cual permite formar cristales ortorrómbicos y le da rigidez al polímero.



Esquema 2. Configuración polimórfica de la α -quitina, a) modelo estructural, b) modelo con líneas.

En la β -quitina las cadenas se alinean de manera paralela como lo hacen las cadenas de la celulosa, formando cristales monocínicos. En este caso se favorecen más los enlaces de hidrógeno intramoleculares frente a las interacciones intermoleculares que predominan en la α -quitina, como se puede apreciar en el Esquema 3. Este tipo de quitina se encuentra comúnmente asociada con proteínas en calamares y diatomeas, y debido a que tiene un empaquetamiento débil comparado con la α -quitina, fácilmente se pueden incorporar moléculas de agua en la red cristalina y lograr en algunos casos su disolución. Estudios sobre la obtención de geles de quitina usando soluciones de metanol saturadas con calcio, han demostrado que la forma β -cristalina tiende a

convertirse de manera irreversible en la forma α -cristalina, confirmando así la estabilidad de esta última (Tamura *et al.*, 2006). Finalmente se encuentra la γ -quitina que es una mezcla de las formas α y β , que combina las propiedades de ambos polimorfismos y logra solamente un hinchamiento en su estructura cuando entra en contacto con el agua.



Esquema 3. Configuración polimórfica de la β -quitina, a) modelo estructural, b) modelo con líneas.

2.2.1 Aplicaciones de la quitina

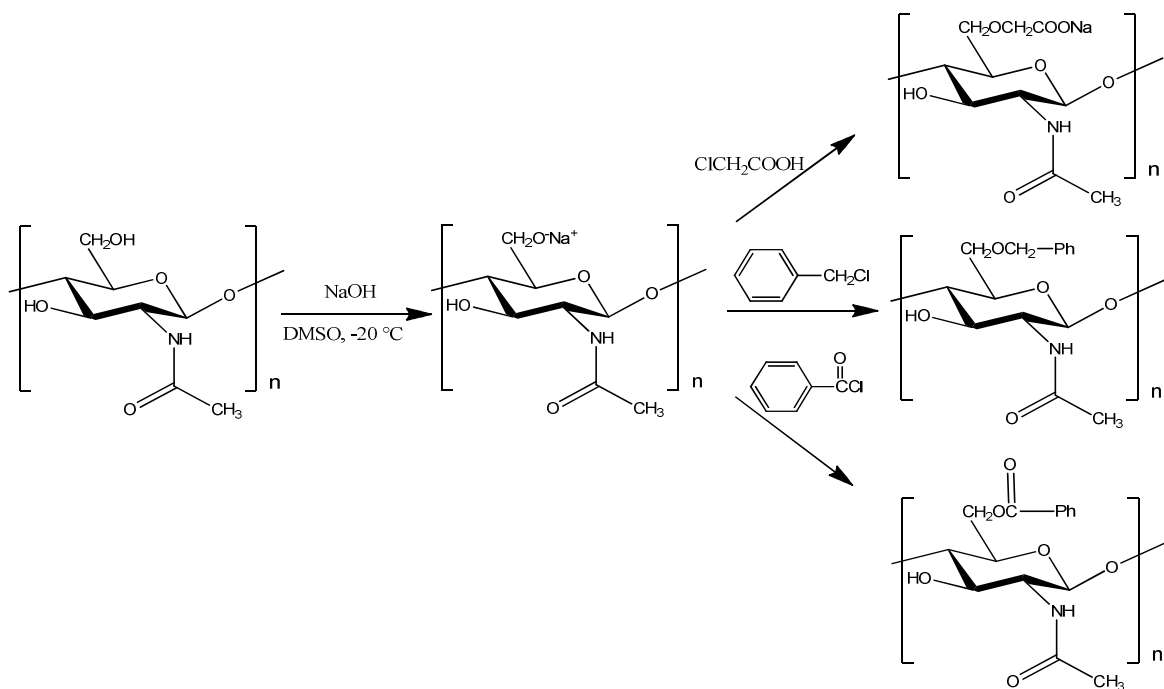
Debido a las interacciones que se generan a lo largo de la cadena polimérica, la quitina tiene la capacidad para formar fibras. Las primeras fibras de quitina se produjeron en 1926 mediante la disolución de ésta en soluciones saturadas de sales inorgánicas como CaBr_2 y CaCl_2 . Estas fibras se pueden emplear para obtener vendajes para heridas y como soportes para la ingeniería de tejidos (Yusof *et al.*, 2003; Muzzarelli, 2009; Jayakumar *et al.*, 2011). También se ha estudiado la formación de hidrogeles de quitina mediante el entrecruzamiento físico de las cadenas utilizando cationes divalentes como el calcio, los cuales

podrían ser útiles para la liberación controlada de fármacos, fertilizantes, pesticidas, etc.

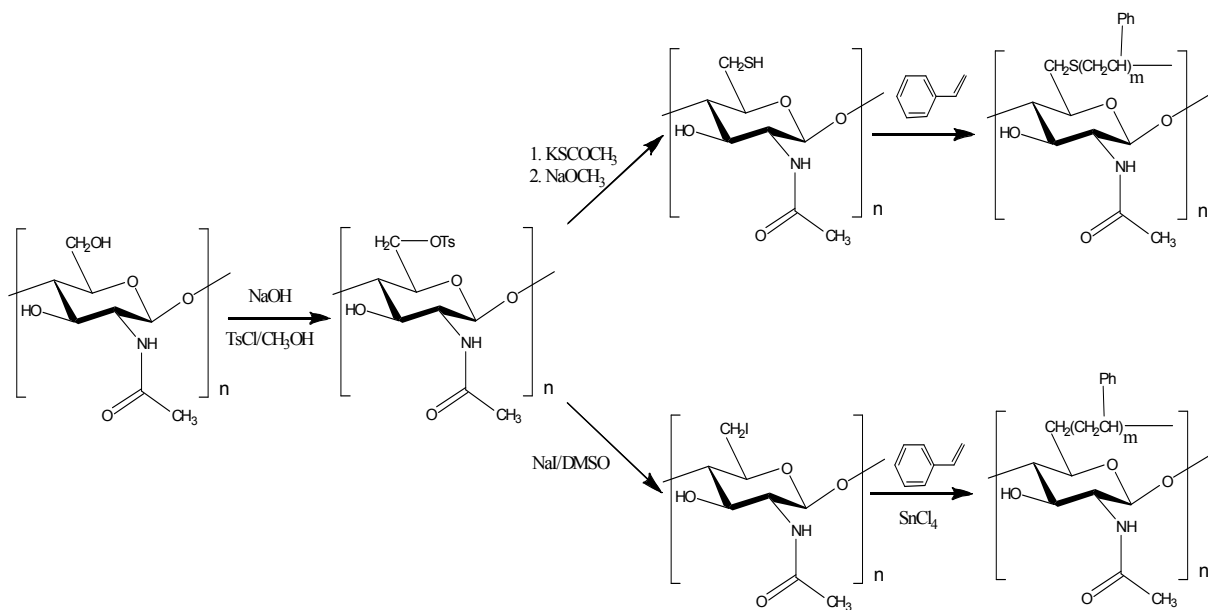
El espectro de aplicaciones para la quitina es pequeño debido a su insolubilidad, sin embargo, las aplicaciones de este polisacárido se ven incrementadas mediante procesos de derivatización o funcionalización. Teniendo en cuenta que la unidad monomérica N-acetilglucosamina tiene un hidroxilo en C-3 y otro en C-6 que pueden participar en diferentes tipos de reacción, se han desarrollado diversos estudios de funcionalización. La mayoría de estos trabajos se centran en la reactividad superior que presenta el grupo hidroxilo de la posición 6 para formar el alcóxido correspondiente, bajo condiciones fuertemente alcalinas como ocurre durante la formación de la o-carboximetilcelulosa, sólo que se requieren además bajas temperaturas para evitar al máximo los procesos de desacetilación en la posición 2. Es así como se ha realizado la o-carboximetilación de la quitina empleando ácido cloroacético a 0 °C (Esquema 4), este derivado ha mostrado buena solubilidad en soluciones acuosas y buenas propiedades como agente de quelación de cationes divalentes como el calcio y el magnesio (Trujillo, 1968; Tokura *et al.*, 1983). Por otra parte, Tokura y colaboradores han realizado estudios de o-alquilación y o-acilación de la quitina mejorando la solubilidad de ésta en solventes orgánicos como DMSO, THF, dioxano, acetona, metanol entre otros (Esquema 4). Vale la pena mencionar, que haciendo la quitina soluble en solventes orgánicos se puede emplear para hacer fibras y películas, o puede utilizarse como aditivo de pinturas, plásticos, entre otros (Somorin *et al.*, 1979; Kaifu *et al.*, 1981).

La tosilación de la quitina es otra de las metodologías usadas para funcionalizarla, debido a la facilidad del grupo tosilo para ser sustituido, la especie tosil-quitina resulta ser un excelente intermediario para la modificación de la quitina. Como se muestra en el Esquema 5, la tosil-quitina se puede transformar en mercapto-quitina o yodo-quitina, los cuales han sido usados para la copolimerización injerto vía radicales libres con poliestireno (Kurita *et al.*, 1992; Kurita *et al.*, 1996),

obteniendo un material híbrido (natural/sintético) con afinidad a los solventes orgánicos.



Esquema 4. Algunas reacciones de o-alkilación de la quitina.



Esquema 5. Tosilación de la quitina y copolimerización injerto con poliestireno.

2.2.2 El hongo *Aspergillus niger* como fuente de quitina

El hongo *Aspergillus niger* está clasificado como un hongo de tipo filamentoso o también llamado “moho”, específicamente perteneciente al grupo de los Deuteromicetos, el cual está ampliamente distribuido en la naturaleza. Se encuentra en hojas secas, en granos almacenados, en abonos para cultivos, y en frutos en descomposición. Cada filamento o hifa del hongo crece en su extremo por un mecanismo de extensión celular como se muestra en la Figura 1 (Madigan *et al.*, 2004). El crecimiento masivo de estas hifas genera lo que se denomina micelio que puede llegar a observarse sin ayuda del microscopio.

Las hifas pueden contener más de un núcleo celular, no obstante, el principal componente de éstas es la pared celular. A diferencia de la pared celular de las plantas que ha sido estudiada desde el siglo XV, la pared celular de los hongos fue considerada por mucho años como una estructura que solamente servía como soporte, sin embargo, a partir del siglo XX las investigaciones en este tipo de estructuras se han incrementado considerablemente y en la actualidad se le atribuyen funciones como la protección de agentes externos, la regulación de la morfogénesis, participación en la reproducción del hongo, recepción de señales externas, entre muchas otras (Feofilova, 2010).

De manera general la pared celular de los hongos tiene componentes estructurales como la quitina, los glucanos (β -1,3 y β -1,6) y en algunos casos celulosa. Además posee manoproteínas, galactoproteínas, α -1,3-glucanos, glucosa, xilosa, lípidos, aminoácidos y N-acetil-D-glucosamina como componentes intraestructurales conocidos como la matriz de la pared celular (Gooday, 1995). En la Tabla 1 se muestra la composición de la pared celular de algunos grupos taxonómicos de hongos.

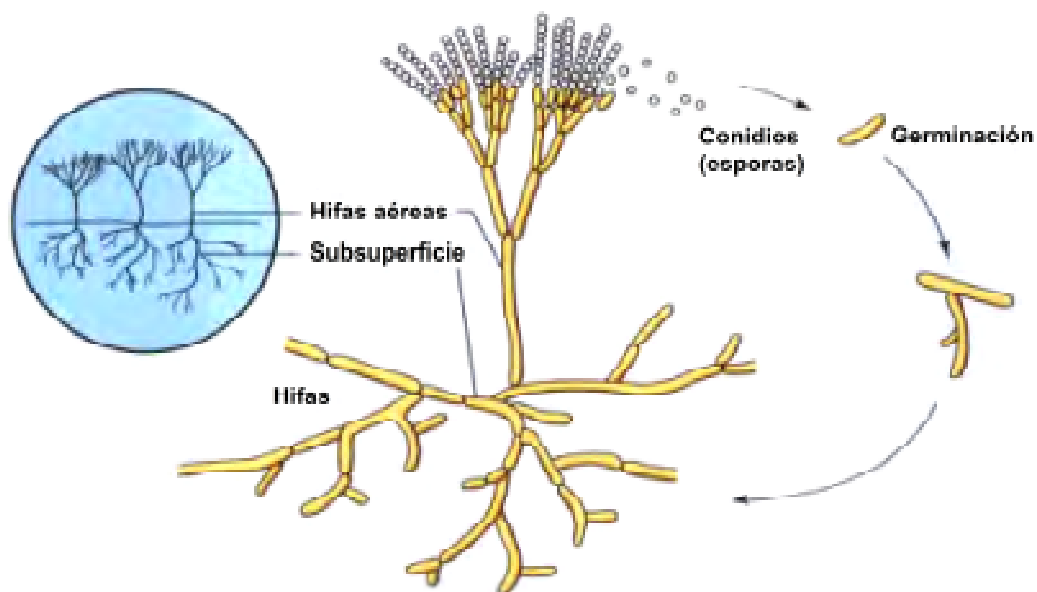


Figura 1. Representación de las hifas durante su crecimiento masivo para la generación de micelio.

Tabla 1. Polisacáridos que conforman la pared celular de algunos hongos.

Grupo	Géneros	Polisacáridos que conforman la pared celular
Acrasiomicetes	<i>Polysphondylium, Dictyostelium</i>	Celulosa-glucógeno
Oomicetes	<i>Phytophthora, Pythium</i>	Celulosa- β -Glucano
Hifoquitridiomicetes	<i>Rhizidiomyces</i>	Celulosa-Quitina
Zygomycetes	<i>Mucor, Phycomyces</i>	Quitina-Quitosano
Deuteromicetes	<i>Aspergillus</i> <i>Schizophyllum, Fomes</i>	Quitina- β -Glucano
Ascomycetes	<i>Saccharomyces, Candida</i>	Glucomanano- β -Glucano
Basidiomicetes	<i>Sporobolomyces, Rhodotorula</i>	Quitina- β -Glucano

Para el caso específico del género *Aspergillus*, la pared celular está compuesta por quitina, β -1,3 y 1,6 glucanos, como también por α -1,3 glucanos. Estos polisacáridos cumplen funciones estructurales dándole la resistencia que requiere la pared celular, como también funciones inmunológicas proporcionándole resistencia al hongo frente a virus, bacterias y parásitos infecciosos (Mislovičová *et al.*, 2000). La quitina se encuentra junto con los glucanos formando microfibras en medio de la matriz de la pared celular. En la Figura 2 se representa la estructura de la pared celular del hongo, los β -1,3/1,6 glucanos ramificados se encuentran principalmente en la superficie de la pared celular, mientras que los β -1,3 glucanos lineales se encuentran asociados físicamente con la quitina en el interior de la matriz, formando lo que se denomina el complejo quitino-glucano que fue aislado en 1979 por el químico italiano Riccardo Muzzarelli (Muzzarelli, 1981).

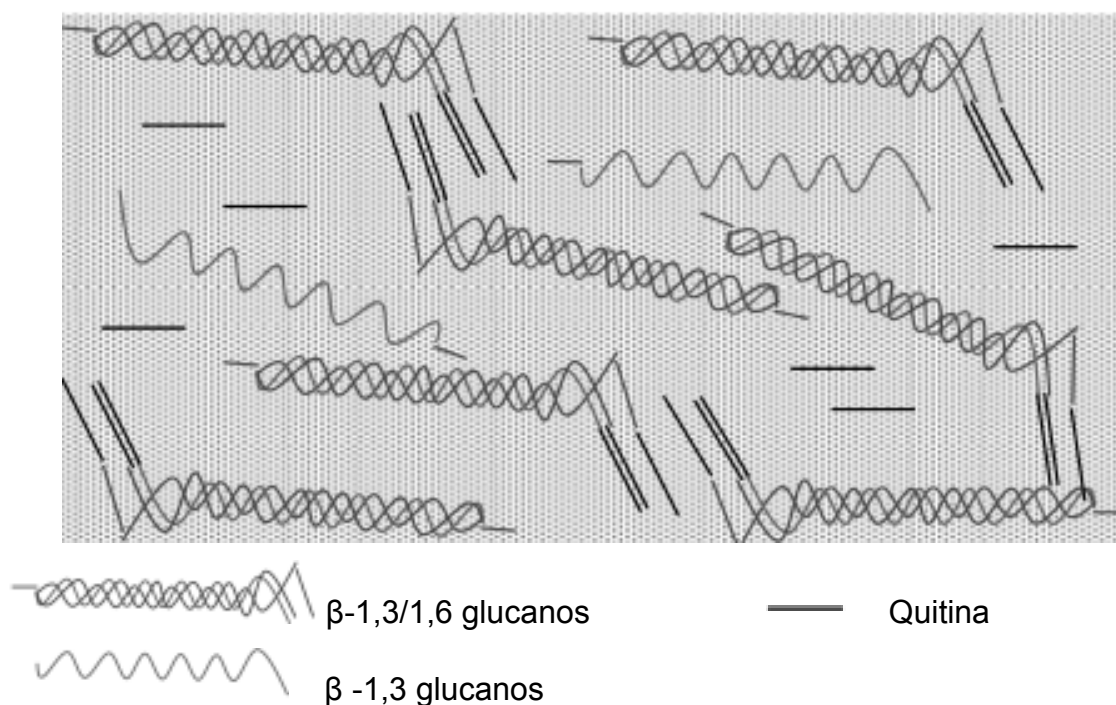


Figura 2. Representación de la pared celular del hongo *Aspergillus niger*.

Durante su proceso de germinación y crecimiento el hongo *Aspergillus niger* experimenta cambios en la composición del complejo quitino/glucano; durante los

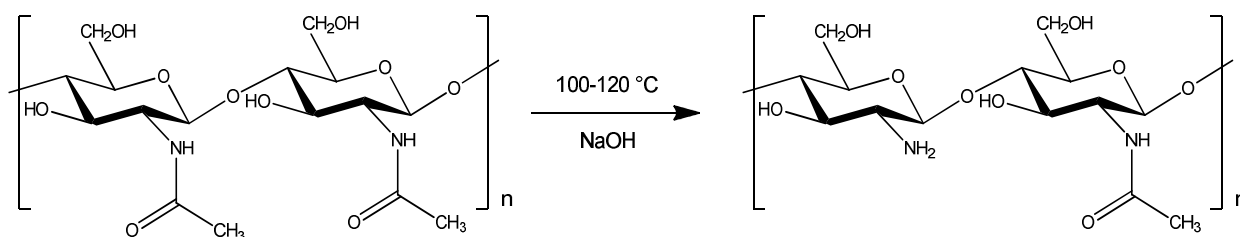
primeros días de germinación las esporas y esporófilos presentan una relación 60/40 del complejo, sin embargo, siete días después cuando hay una cantidad considerable de micelio, la cantidad de quitina cae hasta alcanzar una relación 20/80 para este complejo (Feofilova *et al.*, 2006).

A pesar de su baja solubilidad, el complejo quitino-glucano ha adquirido interés en múltiples aplicaciones, por ejemplo Bornet y Teissedre estudiaron este complejo para remover minerales como el hierro, el plomo y el cadmio, y contaminantes orgánicos como la Ocratoxina A en vinos blancos y rojos producidos al sur de Francia, observando reducciones hasta del 90% de estos contaminantes durante la producción y almacenamiento, mejorando así su calidad y seguridad para el consumo humano (Bornet *et al.*, 2008). También se ha estudiado el crecimiento de tejidos a partir del complejo quitino-glucano usando fibroblastos NIH/3T3 y como auxiliar en procesos de floculación y coagulación para el tratamiento de aguas residuales (Nud'ga *et al.*, 2002; Skorik *et al.*, 2010).

2.3 El quitosano

Mediante una reacción de desacetilación parcial o total de la quitina se obtiene su principal derivado conocido como quitosano, el cual se puede clasificar como un copolímero conformado por unidades de 2-amino-2-deoxi- β -D-glucopiranososa y 2-acetamida-2-deoxi- β -D-glucopiranososa. En general, cuando el contenido de grupos acetilos es mayor del 50% se considera quitina, mientras que para valores menores se considera quitosano. Éste presenta un contenido de nitrógeno de 6.80% o superior y se caracteriza por presentar pesos moleculares entre 1×10^5 y 5×10^5 Da. El descubrimiento del quitosano se le atribuye al profesor Rouget, quien en 1859 halló que calentando la quitina en medio alcalino se obtenía un material que era soluble en ácidos orgánicos. En 1894 el alemán Hoppe-Seyler llama a este material quitosano, sin embargo, sólo hasta 1950 se logró dilucidar su estructura química (Khor, 2001).

De manera general, la obtención del quitosano se basa en una hidrólisis básica del grupo acetamida que se encuentra en la posición 2 como se muestra en el Esquema 6. Cuando se usan las cáscaras de los crustáceos como fuente de quitosano, se requiere dos pre-tratamientos, uno con hidróxido de sodio diluido para eliminar restos de material orgánico y otro con HCl 1 M para eliminar el carbonato de calcio como dióxido de carbono. Posterior a estos pre-tratamientos se lleva a cabo la desproteínización y desacetilación de la quitina, para finalmente llevar a cabo la extracción del quitosano en medio ácido. En el año 2007 en la Universidad del Valle se llevó a cabo la extracción de quitosano a partir de las cáscaras de camarón, el cual posteriormente fue reticulado con glicoxal y usado como soporte de las enzimas celulasa y pectinilasa, para procesos de clarificación de jugos de mora (Orozco, 2007). Abdou y colaboradores han extraído y caracterizado el quitosano de diversas fuentes marinas como el camarón café, el camarón rosado, los calamares, los cangrejos y las langostas (Abdou *et al.*, 2008).



Esquema 6. Desacetilación de la quitina para obtener el quitosano.

Por otra parte, cuando se usan los hongos como fuente de quitosano, sólo se requiere la hidrólisis en medio alcalino donde ocurre simultáneamente la desacetilación de la quitina como también la degradación de proteínas y grasas. Luego de este tratamiento, el quitosano puede ser extraído utilizando una solución ácida diluida. Es así como se han estudiado diferentes tipos de hongos como fuente de quitosano, por ejemplo para el *Mucor rouxii* se reportan rendimientos que van desde 1.2% hasta un 8%, con pesos moleculares promedios entre 0.56×10^5 y 1.6×10^5 Da y grados de desacetilación entre 41 y 70 % (White *et al.*, 1979; Miyoshi *et al.*, 1992; Synowiecki *et al.*, 1997; Chatterjee *et al.*, 2005). Para la

Absidia coerulea se reportan rendimientos de extracción de quitosano alrededor del 10% y pesos moleculares de 4.5×10^5 Da (Miyoshi *et al.*, 1992, Gooday, 1993). Tajdini y colaboradores utilizaron el micelio de *Rhizomucor miehei* y *Mucor racemosus* como fuente de quitosano, empleando NaOH al 10% (p/v) a 121 °C y ácido acético al 5% (v/v) a 95 °C, obteniendo un grado de deacetilación de 98.6% y 97.1% respectivamente (Tajdini *et al.*, 2010). Nwe ha trabajado durante varios años aislando quitosano a partir del hongo *Gongronella butleri*, empleando para la hidrólisis básica NaOH al 46% (p/v) a 46 °C durante 13 h y ácido acético al 2% (v/v) a 95 °C durante 5 h. Este proceso ha tenido rendimientos de 8.2-9.8%, con grados de desacetilación entre 75 y 96% (Nwe *et al.*, 2002; Nwe *et al.*, 2008; Nwe *et al.*, 2011). Dentro de los hongos filamentosos, el *Aspergillus niger* junto con el *Gongronella butleri* han sido destacados por tener gran potencial para la extracción de quitosano, debido a la gran producción de biomasa durante su crecimiento, generando hasta 6.50 g/L de biomasa seca en 9 días de incubación. En el año 2005 Wu y colaboradores reportaron la extracción de quitosano a partir de *Aspergillus niger* empleando 40 mL de NaOH 1 M por cada gramo de micelio seco a 95 °C y ácido acético al 2% (v/v) a 95 °C durante 6 h (Wu *et al.*, 2005); Tayel también ha empleado el micelio del hongo *Aspergillus niger* bajo condiciones alcalinas similares a las reportadas por Wu, y ácido acético al 10% (v/v) a 60 °C durante 6 h (Tayel *et al.*, 2011).

En un contexto nacional, en la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad del Valle en el año de 1994, Cundumí y Arango obtuvieron quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger* proveniente de la empresa Sucromiles S.A., empleando NaOH al 40% (p/v) durante 6 horas a 120 °C y ácido acético al 10% (v/v) con un rendimiento de 3.83% en relación al micelio seco (Cundumí *et al.*, 1994). Por otra parte en 2009, en el Departamento de Química de la Universidad del Valle, Balanta retomó el trabajo planteado por Cundumí y Arango, obteniendo en esta ocasión el quitosano con un rendimiento de 1.07% y un grado de desacetilación de 70-81% (Balanta *et al.*, 2010).

Una de las desventajas del método de extracción química de quitosano es la posible hidrólisis continua del polímero, disminuyendo considerablemente su peso molecular y por ende sus propiedades mecánicas. Por esta razón, se han estudiado procesos biotecnológicos en los que se usa la lisozima para la ruptura celular, diferentes proteasas para la desproteínización de la fuente de quitina y quitina-deacetilasa para obtener finalmente el quitosano, el cual es aislado con una solución diluida de un ácido y se precipita en medio básico (Kučera, 2004; Cai *et al.*, 2006). Este último método presenta como principal ventaja que cada paso es selectivo y se lleva a cabo en condiciones suaves. Sin embargo, los costos de las enzimas son mucho más altos que los reactivos requeridos por el método químico, lo que dificulta su escalamiento a planta piloto o superior.

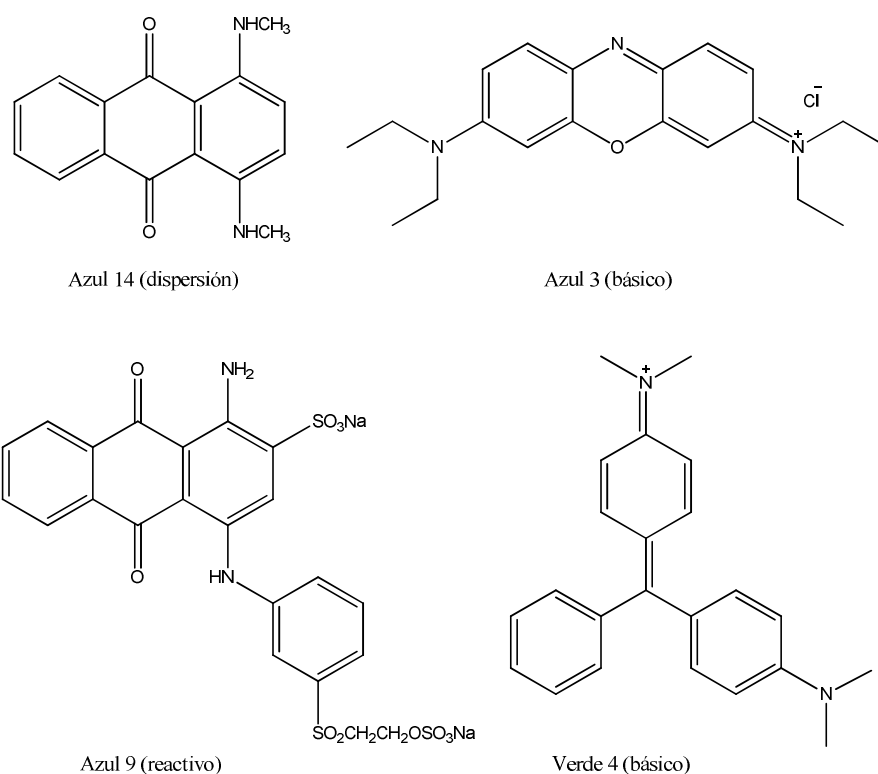
2.3.1 Aplicaciones del quitosano

Como biopolímero el quitosano resulta muy interesante debido a sus potenciales aplicaciones biomédicas, puesto que es biocompatible y biodegradable. Adicionalmente, encuentra múltiples aplicaciones a nivel industrial debido a su solubilidad en medio acuoso, la cual a su vez está relacionada con el grado de acetilación, el peso molecular y la distribución de los grupos acetilo y amino a lo largo de la cadena (Suyatma, 2006). A estas propiedades se le suma su actividad antimicrobiana cuando los grupos amino se encuentran en forma catiónica (Carhuapoma *et al.*, 2005). A continuación se describen algunas de las aplicaciones del quitosano.

2.3.1.1 Tratamiento del agua

Diferentes estudios han demostrado la capacidad que tiene el quitosano para quelar y remover metales pesados del agua, específicamente se reporta la remoción de mercurio, cadmio, níquel, cobre y zinc, utilizando concentraciones de quitosano que van desde 1 hasta 10 ppm con rangos de temperatura entre 25 y 60 °C. En el 2010 Balanta estudió la utilidad que tiene el quitosano no solo para remover metales como el plomo, níquel y cromo sino también como ayudante de floculación de materia orgánica presente en el río Meléndez, reduciendo hasta en

un 50% la dosis óptima del FeCl_3 como coagulante primario (Balanta *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta que el quitosano presenta algunas similitudes con la celulosa, se ha encontrado gran afinidad entre el quitosano y las tintas de aplicación directa o por dispersión. Esta afinidad ha motivado el estudio del quitosano para decolorar los efluentes de las fábricas de tintes, encontrando una gran capacidad de adsorción para diferentes clases de tintes, en el Esquema 7 se muestra algunos de los tintes con los cuales se ha estudiado el quitosano como material de adsorción (Bhavani *et al.*, 1999; Majeti *et al.*, 2000).



Esquema 7. Estructuras de algunos colorantes adsorbidos con quitosano en los efluentes de las fábricas de tintes.

2.3.1.2 Industria del papel y textil

Tanto la quitina como el quitosano pueden formar fibras que mejoran considerablemente la resistencia del papel y disminuyen el consumo de pulpa de celulosa. También se puede mejorar la fijación de tintes en los textiles mediante la adición de fibras de quitosano (Kumar *et al.*, 2004).

2.3.1.3 Agricultura

Debido a su actividad antimicrobiana el quitosano se puede usar como un pesticida biodegradable en cultivos, protegiendo tanto a la planta como a sus frutos. Por ejemplo, en el año 2007 estudios realizados sobre cultivos de tabaco con quitosano, demostraron la efectividad de éste contra el virus del mosaico, mejorando así la producción de este producto (Zhao *et al.*, 2007). Por otra parte, la calidad y cantidad de arroz producido se incrementa al proteger el cultivo con quitosano, eliminando en gran porcentaje las enfermedades que tienden a padecer esta clase de cultivos (Agrawal *et al.*, 2002).

2.3.1.4 Biotecnología

El quitosano encuentra aplicación en la industria de los alimentos como clarificador de jugos, ya que éste permite eliminar ciertas impurezas que pueden afectar el color, el olor y el sabor; se han realizado estudios sobre jugos de manzana, mora y piña. En el año 2007 Orozco en sus estudios de inmovilización de pectinilasa y celulasa en la superficie del quitosano para clarificar jugo de mora, logró mejorar en un 75% su viscosidad y en un 45% la clarificación, mediante trabajos en continuo de hasta 6 ciclos.

2.3.1.5 Industria cosmética

El quitosano forma mezclas hidrocoloidales para aplicaciones cosméticas que permite no solo mejorar la viscosidad del producto sino que además deja abierta la posibilidad de enlazar sustancias antioxidantes, antialérgicas, colorantes, entre otros, a través de los grupos amino libre. Adicionalmente el carácter catiónico del quitosano permite generar interacciones electrostáticas con el cabello que tiene un carácter aniónico, proporcionándole suavidad y resistencia. El quitosano es además un excelente candidato para preparar cremas humectantes para la piel (Majeti *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2004).

2.3.1.7 Alimento y nutrición

Oligómeros de quitosano promueven la generación de lactasas para la digestión de la lactosa de la leche, por lo tanto éste podría ser un complemento nutricional para pacientes que presentan intolerancia a la lactosa. Por otra parte, el quitosano y sus oligómeros actúan como un alimento hipocolesterolémico, Kim y colaboradores demostraron cómo el quitosano reduce hasta en un 23% las grasas presentes en ratones luego de 6 semanas de estudio (Kim *et al.*, 1998).

2.3.1.8 Ingeniería de tejido

En ingeniería de tejido se pretende promover el crecimiento de células para generar tejidos y órganos que puedan sustituir parcial o totalmente partes defectuosas o disfuncionales del cuerpo. Para generar los tejidos es necesario usar un material de soporte entre los cuales se destacan los polímeros naturales y sintéticos. El PLA y el PGA son los polímeros comúnmente empleados para el crecimiento celular de fibroblastos a escala de laboratorio (Wang *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2002). Sin embargo, el quitosano es ahora uno de los principales medios de cultivo celular ya que además de su biocompatibilidad, acelera este proceso de crecimiento. En muchos de estos estudios el quitosano se usa junto con PLA y PGA en forma de películas, estructuras porosas o como perlas (Jarry *et al.*, 2001).

Adicionalmente, el quitosano se puede emplear para generar vendajes bioabsorbibles para el tratamiento de heridas en la piel provocadas durante accidentes o quemaduras.

2.3.1.9 Sistema de liberación de fármacos

Al igual que el agar, el glucomanano y la pectina, el quitosano de bajo peso molecular puede ser usado como excipiente en formulaciones sólidas de fármacos debido a su fácil bioabsorción, con la ventaja de que actúa como un antiácido, previniendo además la irritación estomacal (Majeti *et al.*, 2000).

2.4 Caracterización del quitosano

El peso molecular y el grado de desacetilación son las propiedades más importantes del quitosano, de las cuales depende la calidad del biomaterial y la función o aplicación que podría llegar a realizarse con éste. En la Tabla 2 se resumen los principales métodos empleados para caracterizar el quitosano.

Tabla 2. Métodos de caracterización del quitosano.

Propiedad	Método de Caracterización
Peso Molecular	Viscosimetría GPC (gel permeation chromatography) Light scattering
Grado de desacetilación	Primera derivada en espectroscopía UV Espectroscopía infrarroja Resonancia magnética nuclear (^{13}C , ^1H) Titulaciones potenciométricas Análisis elemental cuantitativo Calorimetría diferencial de barrido (DSC)
Estructura molecular	Resonancia magnética nuclear en estado líquido y sólido (^{13}C , ^{15}N , ^1H)

2.5 Biocompatibilidad y biodegradabilidad del quitosano

La norma ASTM F2475-11 define la biocompatibilidad como la capacidad que tiene un material para ser biológicamente inerte en el cuerpo humano o en cualquier otro huésped mientras realiza determinada función. En otras palabras la biocompatibilidad está directamente relacionada con la citotoxicidad que pueda presentar el material. El método de cultivo celular, es la manera más simple y ampliamente empleada para estudiar tanto la toxicidad como la interacción quitosano-célula. Estudios con fibroblastos L929 soportados en quitosano han

demostrado la biocompatibilidad de este biopolímero al no interferir en el crecimiento celular, al contrario favoreciendo su proliferación.

Por otra parte la norma ASTM D-5488-944 define la biodegradabilidad como la capacidad que tiene un material para descomponerse en moléculas de bajo peso molecular como dióxido de carbono, metano y agua mediante un proceso enzimático. La biodegradación del quitosano está relacionada con su depolimerización, generando inicialmente oligómeros que posteriormente se descomponen a los correspondientes monómeros N-acetilglucosamina y glucosamina. Para llevar a cabo este proceso de depolimerización la naturaleza emplea la enzima bacterial conocida con el nombre de quitinasa, la cual está presente en el tracto digestivo de muchos animales invertebrados y vertebrados como peces, lagartos, aves y en mamíferos como los cerdos. En el caso de los seres humanos la biodegradación del quitosano esta principalmente asociado a la enzima lisozima, la cual se encuentra ampliamente disponible en los macrófagos (Boot *et al.*, 1995).

2.6 Hidrogeles

Un gel es un sistema polimérico de origen natural o sintético, cuyas cadenas se encuentran entrecruzadas a través de enlaces covalentes y no covalentes, adquiriendo la forma de una red tridimensional (ver Figura 3). Estos sistemas pueden absorber gran cantidad de líquidos a través del hinchamiento de su estructura, permaneciendo insoluble y sin perder su forma geométrica original (Shibayama, 1993) es decir, que son sistemas que pueden almacenar en su interior moléculas de bajo peso molecular. En estado seco son sólidos duros y se les conoce como xerogeles, pero cuando entran en contacto con algún disolvente se hinchan hasta alcanzar un equilibrio fisicoquímico, convirtiéndose en sólidos elásticos o blandos. Cuando un gel se hincha por la absorción de agua o soluciones acuosas se denomina hidrogel, mientras que si el hinchamiento se da en presencia de un solvente orgánico se denomina organogel (Wichterle, 1971).

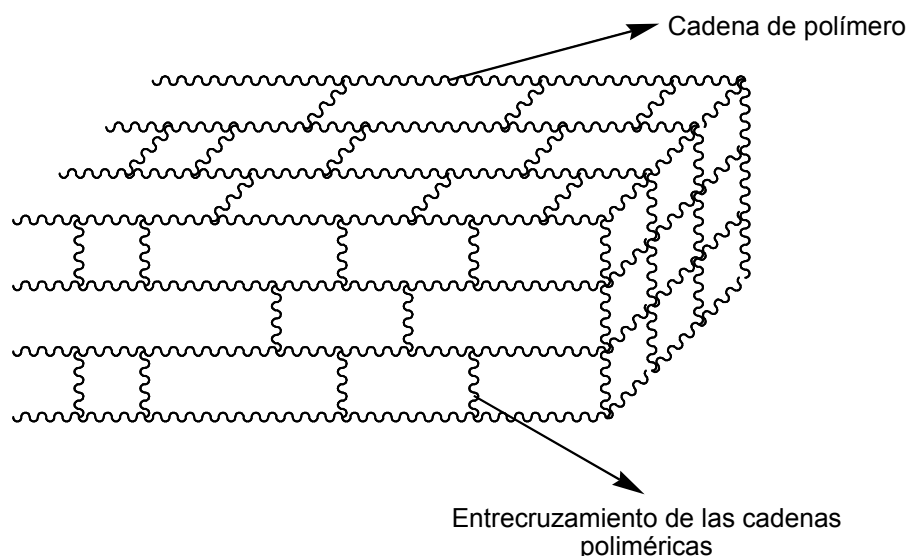


Figura 3. Modelo representativo de un hidrogel.

El carácter hidrofílico de los hidrogeles se debe a la presencia de grupos afines al agua como $-OH$, $-COOH$, $-CONH_2$, $-CONR_2$, $-SO_3H$ (Friends *et al.*, 1993). La insolubilidad del hidrogel se debe a la existencia de una malla o red tridimensional en su estructura, formada por enlaces covalentes y fuerzas cohesivas débiles como fuerzas de Van der Waals, atracciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno. El tacto suave y la consistencia elástica que presentan estos materiales se deben principalmente al gran contenido de agua, el cual está determinado por la presencia de monómeros hidrofílicos y por la baja densidad de entrecruzamiento del polímero (Allen *et al.*, 1992). Por otra parte, los hidrogeles se hinchan aumentando su volumen varias veces sin perder su forma como resultado del balance entre las fuerzas dispersivas y las fuerzas cohesivas intermoleculares, que actúan sobre las cadenas hidratadas del polímero.

Los hidrogeles se pueden clasificar de acuerdo al ordenamiento físico de la red tridimensional, encontrándose hidrogeles amorfos (completamente transparentes), semicristalinos (de apariencia opaca), y agregados hidrocoloidales (Peppas *et al.*, 1986). Otra forma de clasificar los hidrogeles se basa en la naturaleza de los grupos laterales presentes en la red polimérica, encontrándose hidrogeles iónicos (catiónicos, aniónicos, anfóteros) e hidrogeles neutros. También se clasifican

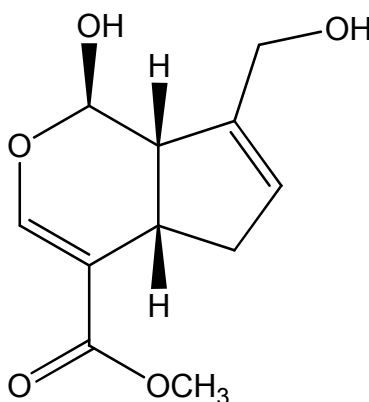
dependiendo del método de preparación y la estrategia sintética empleada como red homopolimérica, copolimérica o como red interpenetrada (Sáenz, 2003).

Se pueden generar hidrogeles a partir de polímeros naturales o sintéticos. Para los hidrogeles sintéticos generalmente se usan reacciones en cadena iniciadas por radicales libres, en las cuales se adiciona simultáneamente monómeros difuncionales y moléculas polifuncionales como agentes de entrecruzamiento. Las propiedades mecánicas, el grado de hinchamiento y la aplicabilidad de los hidrogeles, están directamente relacionadas con las características de los monómeros empleados y la densidad de entrecruzamiento. En la mayoría de los casos, cuando se preparan hidrogeles homopoliméricos no se logra obtener simultáneamente buenas propiedades mecánicas y un alto grado de hinchamiento, por lo que es necesario recurrir a procesos de copolimerización que permitan, mediante una buena combinación de monómeros, mejorar estas dos propiedades. Monómeros como N-metilacrilamida, N-isopropilacrilamida, metacrilato de 2-hidroxietilo y la acrilamida, son comúnmente copolimerizados con monómeros ionizables como ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido estirensulfónico y vinilsulfónico, ácido itacónico, etilenimina, entre otros. Para esta clase de hidrogeles los agentes entrecruzantes comúnmente empleados son: dimetacrilato de etilenglicol, dimetacrilato de dietilenglicol, dimetacrilato de 2-hidroxitrimetileno y N,N-metilenbisacrilamida (Huglin *et al.*, 1990; Sánchez *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1994).

Otra forma de generar hidrogeles es mediante el entrecruzamiento de cadenas poliméricas de origen natural. Esta clase de hidrogeles llaman la atención debido a la inminente biodegradabilidad que presenta esta familia de polímeros, lo cual los hace especiales para aplicaciones biomédicas. Se han preparado hidrogeles de dextrano empleando hidroxietilmetacrilato (HEMA) y carbonato para su entrecruzamiento, mostrando una marcada biodegradabilidad bajo condiciones fisiológicas (Van Dijk-Wolthuis *et al.*, 1997). El glucomanano también se ha usado para preparar hidrogeles mediante la generación de copolímeros injerto con

monómeros acrílicos, los cuales se pueden entrecruzar fácilmente mediante radicales libres. El alginato (copolímero de ácido galurónico y manurónico) se puede entrecruzar físicamente mediante la adición de cationes divalentes como Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} ó Ba^{2+} , generando hidrogeles que presentan propiedades de biocompatibilidad, mucoadhesión y fácil manipulación (Drury *et al.*, 2004; Coviello *et al.*, 2007).

A partir del quitosano se pueden formar hidrogeles físicos o químicos que son sensibles a estímulos externos como el pH. En un medio ácido los grupos amino libres del quitosano se encuentran protonados generando repulsión de cargas que promueven el hinchamiento del material polimérico (Gil *et al.*, 2004). Para llevar a cabo la formación de hidrogeles químicos de quitosano se pueden usar tanto los grupos hidroxilos en C-3 y C-6, como también el grupo amino ubicado en C-2, siendo más usado este último por su carácter nucleofílico a la hora de reaccionar con el agente entrecruzante. Por tal motivo las cadenas de quitosano se suelen entrecruzar con dialdehídos como el glioxal y el glutaraldehído. También se ha utilizado la genipina (Esquema 8), un compuesto que se extrae a partir del fruto de la Gardenia jasminoides y la Genipa americana (Muzzarelli, 2009). Bodnar y colaboradores reportaron la preparación de nanohidrogeles de quitosano, utilizando ácidos di y tricarboxílicos como agentes entrecruzantes no tóxicos, que contribuyen a la biocompatibilidad del material (Bodnar *et al.*, 2005).



Esquema 8. Estructura química de la genipina.

Debido a la biocompatibilidad del quitosano, los hidrogeles no solo se pueden emplear para la liberación controlada de medicamentos como por ejemplo la insulina (Sarmiento *et al.*, 2007), sino que también se pueden hacer membranas de hemodiálisis, suturas biodegradables, sustituyentes artificiales de la piel, agentes cicatrizantes en quemaduras, inmovilizadores de enzimas y células, entre otros.

El grado de entrecruzamiento influye en factores como el tamaño de poro del material, la resistencia mecánica y el porcentaje de hinchamiento. Actualmente se tiene claro que pequeñas cantidades del agente entrecruzante aumentan la capacidad de absorción y a medida que aumenta la densidad de entrecruzamiento el hinchamiento se reduce debido a que disminuye la movilidad de las cadenas poliméricas.

2.6.1 Características de los hidrogeles

Vale la pena mencionar algunas propiedades encontradas en los hidrogeles, las cuales los han convertido en tema de investigación actual:

2.6.1.1 Transición de fase

Los xerogeles se caracterizan por ser sólidos amorfos y en algunos casos semicristalinos. Sin embargo, cuando se hinchan presentan propiedades típicas tanto de sólidos como de líquidos al adquirir cierta elasticidad. Este material puede contener en su interior hasta un 99% de su peso en líquidos como el agua (Parejo *et al.*, 1998). Durante el proceso de hinchamiento se presentan grandes cambios de volumen, lo cual se considera una transición de fase y es dependiente de agentes externos como la temperatura, cambios de pH o alteraciones de la concentración de electrolitos. En la Figura 4 se representan los dos posibles estados en los que se puede hallar un hidrogel.

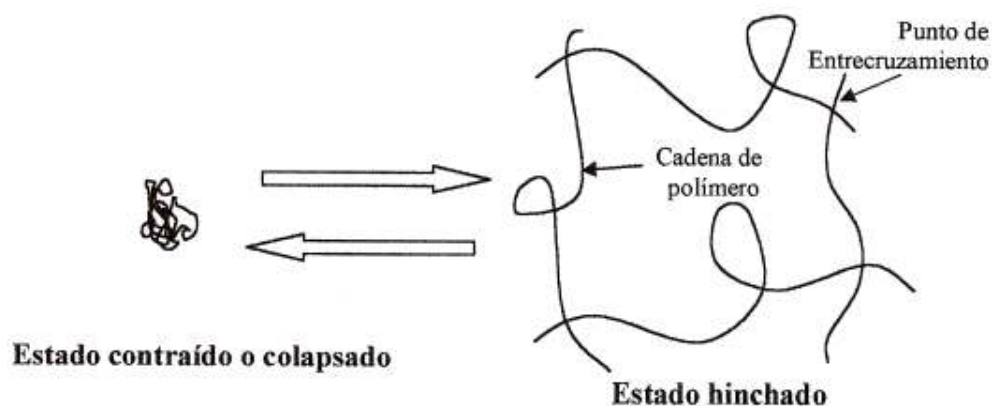
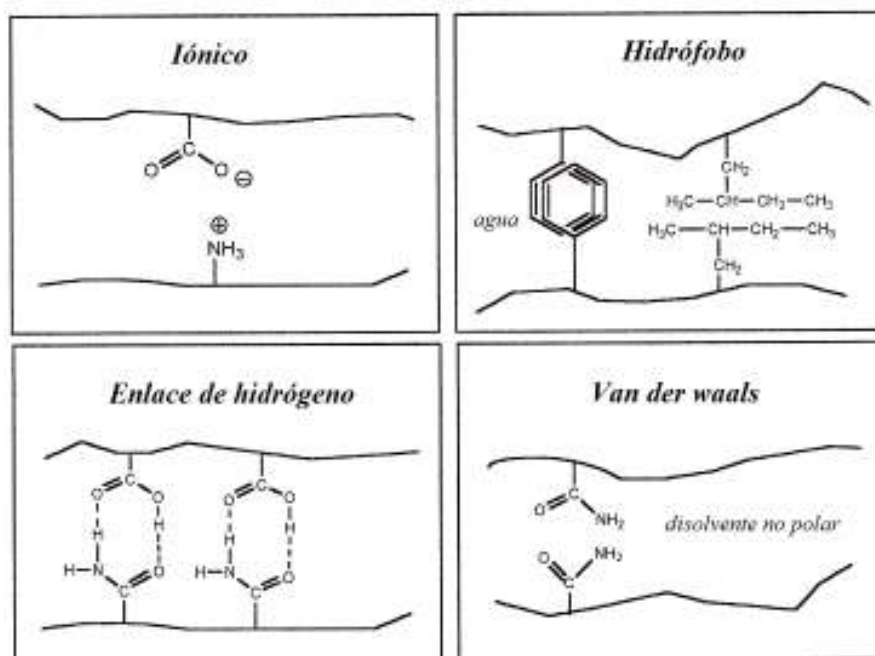


Figura 4. Estado contraído e hinchado en los que se puede encontrar un hidrogel debido a la transición de fase.

Esta transición de fase fue descrita teóricamente por Dusek y Patterson en 1968 (Dusek *et al.*, 1968), quienes postularon la existencia de una variación discontinua y abrupta del volumen de un gel, por analogía con la transición globular descrita para muchos polímeros por Pititsen y colaboradores tres años atrás (Pititsen *et al.*, 1965). Dicha transición fue demostrada experimentalmente en 1978 por Tanaka, empleando poliacrilamidas parcialmente ionizadas y utilizando como medio de estudio una mezcla de acetona/agua (Tanaka, 1978).



Esquema 9. Principales interacciones intermoleculares que intervienen en la transición de fase.

En el Esquema 9 se representan los cuatro tipos de interacciones que intervienen y determinan el comportamiento del hidrogel durante la transición de fase a nivel molecular.

Las interacciones electrostáticas o coulómbicas, son de largo alcance e inversamente proporcionales a la constante dieléctrica del medio, se pueden introducir en la cadena polimérica mediante la ionización parcial o total de los grupos ionizables, lo que da lugar a interacciones de repulsión. Como las cargas no pueden desplazarse al estar unidas a la cadena, los contraiones tienden a estar localizados cerca de ellas para mantener un equilibrio eléctrico en el sistema. Como resultado se crea un potencial Donnan entre el interior y el exterior del gel, con el consiguiente incremento de la presión osmótica interna, produciendo el hinchamiento del material (Parejo *et al.*, 1998).

Las interacciones hidrofóbicas se pueden controlar en el caso de los polímeros sintéticos, sustituyendo el grupo lateral de las cadenas poliméricas con grupos no polares. Estas interacciones se hacen evidentes porque las moléculas de agua en un ambiente de cadenas poliméricas hidrofóbicas, forman microdominios muy ordenados con una estructura similar a las moléculas de agua en cristales de hielo.

Los enlaces de hidrógeno con energías de enlace entre 3 y 9 kcal/mol juegan un papel importante en las propiedades físicoquímicas de muchos polímeros, ya que se establecen tanto intramolecular como intermolecularmente y son los responsables de interacciones cooperativas que se desarrollan entre segmentos de cadena (Eustace *et al.*, 1988).

Por último, se encuentran las fuerzas de Van der Waals o afinidad polímero-polímero, que fueron evidenciadas en 1980 por Tanaka cuando realizó sus estudios con geles de poliácridamida parcialmente ionizada en la mezcla

agua/acetona (Tanaka *et al.*, 1980). La acetona por ser un disolvente polar aprótico (mal disolvente de poliacrilamidas) da lugar a un aumento de las interacciones entre las cadenas de polímero en la red tridimensional, originando una transición de volumen en el material.

2.6.1.2 Equilibrio de hinchamiento

Una vez los hidrogeles entran en contacto con el agua, se empieza a dar un proceso de difusión hacia el interior de la red polimérica, lo cual conduce a un proceso de hinchamiento el cual es favorecido termodinámicamente. Durante este proceso las cadenas poliméricas que conforman el hidrogel asumen una configuración elongada, generando una fuerza retráctil en oposición al hinchamiento. A medida que la red tridimensional se hincha, la presión elástica de las cadenas aumenta y se alcanza un equilibrio de hinchamiento cuando ambas fuerzas se igualan. La máxima cantidad de agua que puede contener el hidrogel en el equilibrio de hinchamiento está entonces directamente relacionada con la presencia de los monómeros hidrofílicos y con la densidad de entrecruzamiento de las cadenas.

2.6.1.3 Sensibilidad al medio

Los hidrogeles han recibido el adjetivo de inteligentes ya que poseen la capacidad de realizar un hinchamiento selectivo frente a diferentes estímulos del medio, entre los que se encuentran: el pH, la temperatura o la fuerza iónica.

- *Hidrogeles sensibles al pH*

La presencia de grupos ionizables en la red polimérica permite generar una respuesta frente al pH. Esta clase de hidrogeles también es denominada comúnmente polielectrolitos entrecruzados.

En la Tabla 3 se presentan algunos grupos funcionales ionizables a partir de los cuales se podrían generar hidrogeles sensibles a cambios de pH. Uno de los primeros trabajos sobre este tema lo realizó Katchalsky, quien estudió el

hinchamiento de hidrogeles a base de poli(ácido metacrílico); en estos primeros estudios con ácidos carboxílicos quedó establecido que el aumento del pH incrementaba el número de cargas fijas (iones carboxilato) en la red tridimensional, lo cual produce un aumento en la repulsiones electrostáticas entre las cadenas, incrementando el hinchamiento del material (Katchalsky *et al.*, 1995).

Tabla 3. Grupos funcionales ionizables a partir de los cuales se pueden obtener hidrogeles sensibles al pH.

Grupos aniónicos	Grupos catiónicos
$-COO^-$	$-N^+ -$
$-OPO_3^-$	$-NH^+$
$-OSO_3^-$	$-NH_2^+$
$-SO_3^-$	$-NH_3^+$
$-OCS_2^-$	$-NRNH_2^+$
$-OPO_3^{2-}$	$-NR_2H^+$
$-PO_3^{2-}$	$-NR_3^+$
PO_2^{2-}	$-S^+$
$-SiO_2^{2-}$	$-P^+ -$

Se puede obtener el efecto contrario si se emplean hidrogeles con grupos funcionales como las aminas, los cuales se ionizan a pH bajos, generando fuerzas repulsivas entre cargas positivas y el consecuente incremento en el hinchamiento. Khare y Peppas retomaron los estudios con el poli(ácido metacrílico) y observaron una dependencia directa del hinchamiento con el pH y la fuerza iónica del medio (Khare *et al.*, 1995).

- *Hidrogeles termosensibles*

Otro parámetro determinante en el proceso de hinchamiento de hidrogeles es la temperatura. En las últimas dos décadas se han sintetizado diferentes hidrogeles capaces de hincharse o colapsar dependiendo de la temperatura del medio. El

primer estudio sobre la transición de fase en volumen de un hidrogel termosensible fue realizado en 1987 por Hirokawa y Tanaka empleando derivados de poliacrilamidas como la N-isopropilacrilamida (NIPA), la dietilacrilamida y la dimetilacrilamida (Hirokaw *et al.*, 1987). La respuesta selectiva de los hidrogeles con los cambios de temperatura está relacionada con el balance entre los diversos tipos de interacciones que existen en el sistema, especialmente con los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrófobas.

- *Hidrogeles sensibles a otros estímulos*

Algunos hidrogeles presentan transición de fase frente a otras variables como son: la composición del disolvente, la presencia de luz ultravioleta y la fuerza iónica del medio. También se han obtenido hidrogeles bioquímicamente sensibles, los cuales son perturbados por agentes bioactivos como enzimas o receptores que forman complejos y logran la transición de fase hacia el hinchamiento o el colapso del material (Okano *et al.*, 1990).

2.6.2 Aplicaciones de los hidrogeles

Los hidrogeles han sido tema de estudio por más de medio siglo, por lo que hoy en día se tiene un claro entendimiento de muchas de sus características. Esto ha permitido enfocar estratégicamente la síntesis de nuevos hidrogeles dependiendo de la aplicación que se le desea dar al material.

Los primeros trabajos en este campo fueron realizados por Kuhn y colaboradores a comienzo de los años 50, estudiando básicamente la síntesis y características termodinámicas de poliácidos acrílicos y metacrílicos entrecruzados (Kuhn *et al.*, 1950). A partir de estos estudios nace en los años 60 un interés por los polímeros con propiedades superabsorbentes por parte de Bashaw y Harper, quienes propusieron y patentaron el uso de los hidrogeles para inmovilizar agua y emplearlos en la lucha contra incendios (Bashaw *et al.*, 1966). Posteriormente, en 1972 Harper y Harmon estudiaron y patentaron el uso de este tipo de materiales como productos para la higiene personal, y fue así como en los años 80 se

desencadenó la aplicación a gran escala de estos materiales, teniendo la mayor acogida en la fabricación y comercialización de pañales desechables y productos para el aseo personal en general (Harper *et al.*, 1972; Harmon, 1972). Por esa misma época surgió el interés de emplear los hidrogeles en la agricultura, para mejorar la capacidad de retención de agua del suelo, favoreciendo por tanto el desarrollo de las plantas, la recuperación de zonas semiáridas y terrenos de cultivo poco fértiles (Martínez *et al.*, 1997). También se han empleado como supra-absorbentes controladores de ambiente húmedo, en el control de componentes aromatizantes y en la dosificación de pesticidas en cultivos. Rojas y colaboradores reportaron en el 2004 la preparación de hidrogeles a través de la copolimerización por radicales libres del ácido itacónico y la acrilamida, y estudiaron la liberación controlada del plaguicida Bromacil desde estos hidrogeles durante 4 días a diferentes valores de pH y una temperatura de 23 °C (Rojas *et al.*, 2004)

Por otra parte, se vienen implementando procesos de descontaminación ambiental empleando hidrogeles para atrapar metales pesados. Esta aplicación se debe a la presencia de grupos ionizables en la red tridimensional, la cual permite atraer metales por fuerzas electrostáticas. En un estudio realizado por Katime y Rodríguez se demostró cómo se lleva a cabo eficientemente la adsorción de Cu^{2+} y Zn^{2+} con hidrogeles de poli(ácido acrílico-co-ácido itacónico) (Katime *et al.*, 2001).

Paralelo a esta historia, en 1960 Wichterle y Lim sintetizaron hidrogeles de poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (PHEMA) y resaltaron su posible uso en aplicaciones biomédicas (Wichterle *et al.*, 1960). Esto dio inicio al desarrollo de nuevos hidrogeles con fines biomédicos, como lentes de contacto, revestimiento de suturas, membranas de hemodiálisis y liberación controlada de fármacos. Recientemente se ha publicado la síntesis de hidrogeles a partir de mezclas de poli(N-vinilpirrolidona) (NVP) y poli(alcohol vinílico-co-acetato de vinilo) en presencia de glutaraldehído para sustituir algunos tejidos blandos del cuerpo humano. En el 2007 el magazín de nuevas tecnologías médicas MedGadget

anunció que los profesores Joel Schneider y Darrin Pochan de la Universidad de Delaware patentaron un nuevo tipo de hidrogel obtenido a partir de péptidos, el cual fue diseñado para sanar heridas en la piel y al mismo tiempo liberar medicamentos antibacteriales (MedGarget, 2007). Con toda esta nueva gama de aplicaciones, ahora los hidrogeles se pueden clasificar como biomateriales poliméricos.

Como sistemas de liberación de fármacos, los hidrogeles se han estudiado para la liberación controlada de antibióticos, analgésicos, antineoplásticos, entre muchos otros medicamentos. Uno de los principales desafíos de esta área es el desarrollo de sistemas (hidrogel-medicamento) que permitan la liberación de fármacos de modo constante, en la dosis deseada, durante un período de tiempo prolongado y en el sitio adecuado. Diversos hidrogeles tanto de origen natural como sintético se han propuesto para liberar fármacos de forma controlada. Katime de la Universidad del País Vasco y Sánchez de la Universidad Nacional de Colombia publicaron en 1996 la obtención de hidrogeles a través de la copolimerización de diferentes monoésteres derivados del ácido itacónico y la acrilamida, y estudiaron estos materiales bajo diferentes condiciones de pH y temperatura (Sánchez *et al.*, 1996). Chen y colaboradores por su parte, publicaron la síntesis de hidrogeles a partir de glucomanano (un polisacárido de glucosa y manosa) y ácido acrílico, obteniendo sistemas de liberación controlada resistentes a la degradación de las enzimas del tracto gastrointestinal y con respuesta selectiva al pH (Chen *et al.*, 2005). Sáez del Grupo de Nuevos Materiales de la Universidad del País Vasco estudió los mecanismos que gobiernan la liberación controlada de fármacos desde materiales poliméricos (Sáez *et al.*, 2004). En la actualidad existe una gran cantidad de estudios sobre liberación de principios activos desde matrices poliméricas. En la Tabla 4 se destacan algunos de estos trabajos.

Tabla 4. Algunos hidrogeles de origen natural y sintético estudiados como sistemas de liberación controlada de fármacos, con sus respectivos principios activos estudiados.

	HIDROGEL	FÁRMACO LIBERADO
Polímeros sintéticos	Poli(ácido metacrílico-co-acrilamida)	Cefazolina sódica
	Poli(ácido metacrílico)	Metoclopramida
	Poli(ácido metacrílico-co-etilenglicol)	Insulina
	Poli(ácido metacrílico-co-HEMA)	Timolol
	Poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-ácido acrílico)	Vitamina B12
	Poli(acrilamida-co-monopropil itaconato)	5-Fluorouracilo
Polímeros naturales	Glucomanano	Ácido 5-aminosalicílico
	Alginato	Metoclopramida
	Dextrano-Lactato-HEMA	Inmunoglobulina G
	Quitosano	Paclitaxel
	Acetato de pullulan	Clonazepam
	Carragenina	Amitriptilina

2.7 Sistemas de liberación controlada

En los sistemas de liberación controlada desde matrices poliméricas, la velocidad de liberación del principio activo está prácticamente controlada por las propiedades del polímero y se clasifican como transportadores químicos y transportadores físicos, de acuerdo a la forma como se incorpora el fármaco en el biomaterial.

2.7.1 Sistemas controlados por difusión

Cuando la unión entre el polímero y el ingrediente activo es de carácter físico, la liberación es controlada por el fenómeno de difusión, ya sea a través de la estructura molecular del polímero o bien a través de macroporos que existen en el

biomaterial. En este primer grupo se encuentran incluidas cuatro subclases de sistemas:

a) *Sistemas con núcleo interno que contiene el fármaco.* Se trata de una cavidad central en la que se encuentra el principio activo rodeado por una membrana delgada, homogénea y no porosa. El principio activo está contenido dentro de una capa de polímero, la cual puede hincharse o no en el medio biológico donde se aplica. El transporte del fármaco al exterior se da por la disolución de este en la interfase soluto/polímero, a través de los segmentos macromoleculares y bajo la influencia de un gradiente de concentración que sigue la primera ley de Fick (Korsmeyer *et al.*, 1981; Langer *et al.*, 1983). En la Figura 5 se puede observar este tipo de sistema antes y durante el proceso de liberación.

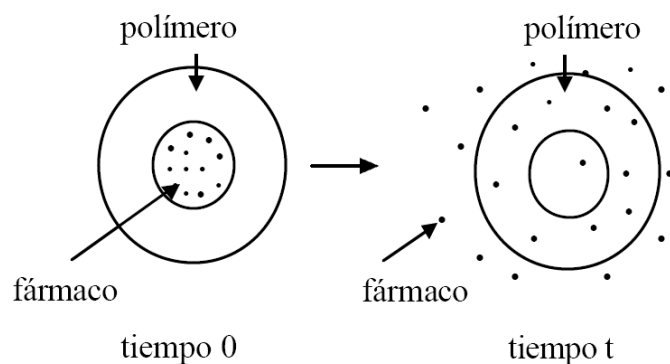


Figura 5. Sistema de liberación controlada con núcleo interno.

b) *Dispositivos monolíticos.* En estos sistemas el compuesto farmacológico se encuentra uniformemente distribuido en el soporte polimérico. En este caso la migración del fármaco al medio exterior se produce por difusión molecular a través del soporte ya mencionado. En la Figura 6 se representa esta clase de sistema.

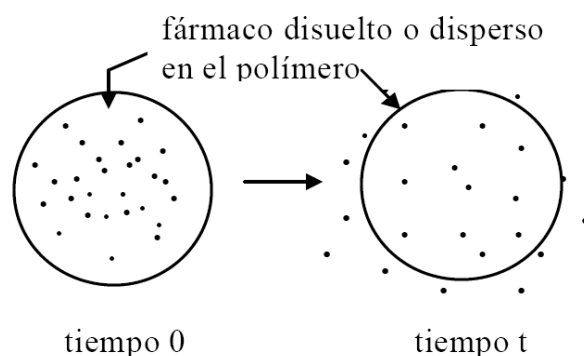


Figura 6. Dispositivo monolítico para la liberación controlada.

La interpretación del fenómeno de difusión en este sistema puede realizarse utilizando la segunda ley de Fick. En cualquier caso, se produce una disminución de la velocidad de migración del fármaco con el tiempo, debido principalmente a que el recorrido de difusión aumenta de forma continua, lo que puede ser una desventaja para su formulación como sistema de liberación a velocidad constante.

c) *Sistemas controlados por hinchamiento.* Son sistemas similares a los monolíticos, sólo que esta vez el ingrediente activo se encuentra disperso en un soporte de polímero hidrofílico y entrecruzado, el cual se hincha sin disolverse cuando se pone en contacto con un medio acuoso. Se trata entonces de los ya mencionados hidrogeles. La migración del fármaco al medio acuoso desde un sistema de esta naturaleza implica un proceso de absorción de agua y otro simultáneo de desorción del ingrediente activo por un mecanismo de difusión controlado por el hinchamiento que sufre el polímero. En la Figura 7 se puede ver la representación de este sistema.

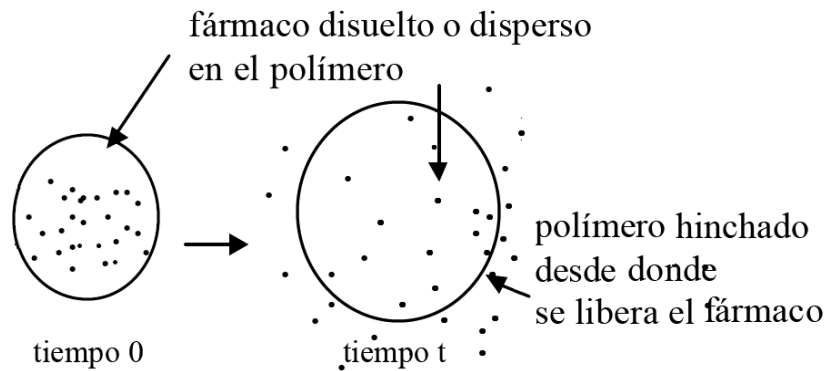


Figura 7. Sistema de liberación controlada por hinchamiento.

2.7.2 Sistemas controlados por vía química

En este segundo grupo de sistemas transportadores de fármacos, la liberación se produce mediante una reacción química, en la cual se lleva a cabo la ruptura de la unión fármaco-polímero. Esta ruptura puede ser un ataque hidrolítico o enzimático, una ionización o una protonación. En este segundo grupo se encuentran incluidas principalmente dos subclases:

a) *Sistemas bioerosionables.* En estos sistemas el ingrediente activo se encuentra disperso en un material polimérico biodegradable, el cual se va erosionando con el tiempo a través de procesos físicos como hinchamiento, deformación o desintegración estructural, permitiendo así la liberación del fármaco. En la Figura 8 se representa este sistema.

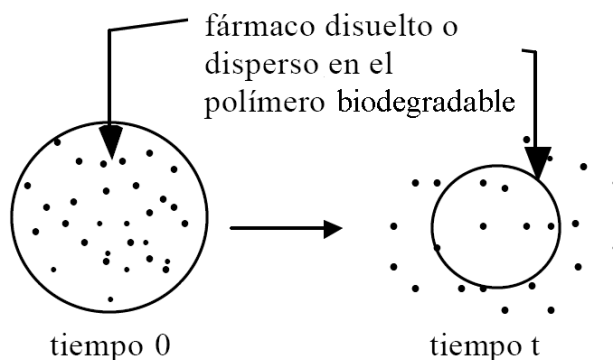


Figura 8. Sistema de liberación bioerosionable.

b) *Sistemas de cadenas laterales*. En este caso el fármaco se encuentra unido químicamente a las ramificaciones del polímero y es liberado principalmente por una ruptura hidrolítica o enzimática (ver Figura 9). En el caso en el que se emplean enzimas para catalizar la hidrólisis, la velocidad de liberación del fármaco puede acelerarse o retardarse (Sáez *et al.*, 2004).

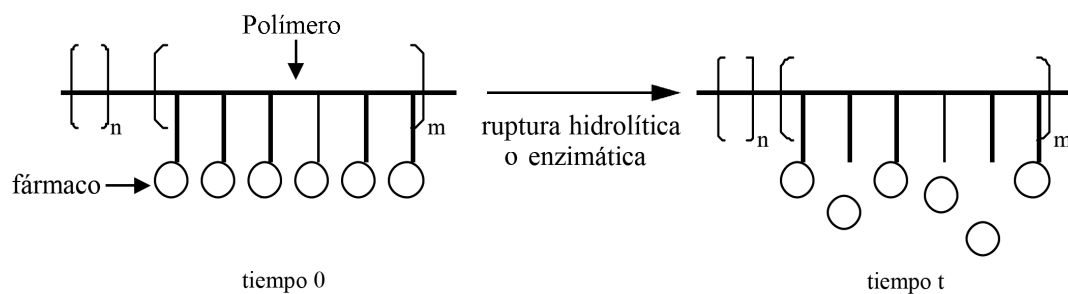


Figura 9. Sistema de liberación de cadenas laterales.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3.1 Extracción quitosano

A pesar de que la quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, con una producción anual de 10^{11} ton, su proceso industrial de extracción se ha limitado a las fuentes marinas como los cangrejos, camarones y langostinos. Este proceso está entonces direccionado a ciertas regiones del planeta donde haya abundancia de estas especies y está restringido además a determinadas temporadas del año donde haya proliferación de ellas. Adicionalmente, el proceso de extracción de quitosano de fuentes marinas se caracteriza por ser un proceso complejo que envuelve etapas previas de desmineralización para eliminar carbonatos y desproteinización debido a que la quitina en estos casos está asociada covalentemente a las proteínas. Sólo después de estos pre-tratamientos es posible llevar a cabo la desacetilación de la quitina y la extracción del quitosano en medio ácido. Debido a la gran aplicabilidad del quitosano, la cual está fundamentada en su biodegradabilidad, biocompatibilidad y abundancia en la naturaleza, es evidente la necesidad de implementar procesos de extracción de quitosano a partir de fuentes diferentes a las marinas, que sean asequibles en cualquier época del año, de bajo costo y que requieran procesos más sencillos de extracción.

Por otro lado la empresa Sucromiles S.A. afincada en el Valle del Cauca, durante la producción de ácido cítrico a partir de la caña de azúcar, obtiene anualmente como coproducto 13500 ton de micelio del hongo *Aspergillus niger*, el cual presenta poca aplicabilidad y una escasa comercialización como suplemento alimenticio para ganado. Debido a su naturaleza orgánica y su alto contenido de humedad, el micelio tiende a descomponerse en un lapso de dos semanas generando un impacto ambiental negativo; sin embargo, uno de los principales componentes del micelio es la quitina, la cual se encuentra junto con los glucanos conformando la pared celular. En este orden de ideas, mediante la desacetilación

de la quitina es posible entonces obtener un quitosano de origen no-animal, el cual se puede extraer en cualquier época del año, dándole además un valor agregado a este coproducto industrial, esperando así contribuir con el desarrollo socio-económico de la región.

3.2 Obtención de hidrogeles de quitosano

Cuando a una persona se le administra un fármaco se espera el efecto curativo de algún síntoma o enfermedad; este efecto sólo es posible si el fármaco es transportado eficazmente a través del organismo humano con una buena biodisponibilidad y en las concentraciones terapéuticas adecuadas. Sin embargo, algunos fármacos presentan problemas farmacocinéticos como tiempos de vida media cortos o estrechos márgenes de concentración terapéutica, lo que resulta en una disminución de su eficiencia si la concentración de fármaco está por debajo del intervalo terapéutico o el riesgo de intoxicación si por el contrario la concentración es superior a la esperada. Una forma de evitar estos problemas es mediante el empleo de formulaciones de liberación controlada, que tradicionalmente han sido matrices poliméricas (Figura 10). Las proteínas usadas como fármacos producto de la revolución biotecnológica, son un buen ejemplo de sustancias que requieren una liberación controlada debido a que son moléculas que fácilmente se pueden degradar bajo condiciones gastrointestinales, impidiendo que este fármaco alcance su concentración terapéutica adecuada en el organismo. En este orden de ideas, las cadenas de quitosano pueden ser entrecruzadas químicamente, generando redes tridimensionales conocidas como hidrogeles. Estos materiales se caracterizan por realizar una liberación controlada mediante fenómenos de difusión tanto intracorpóreo como a nivel epidérmico de medicamentos y nutrientes, manteniendo de esta manera una concentración constante del principio activo por un tiempo prolongado.

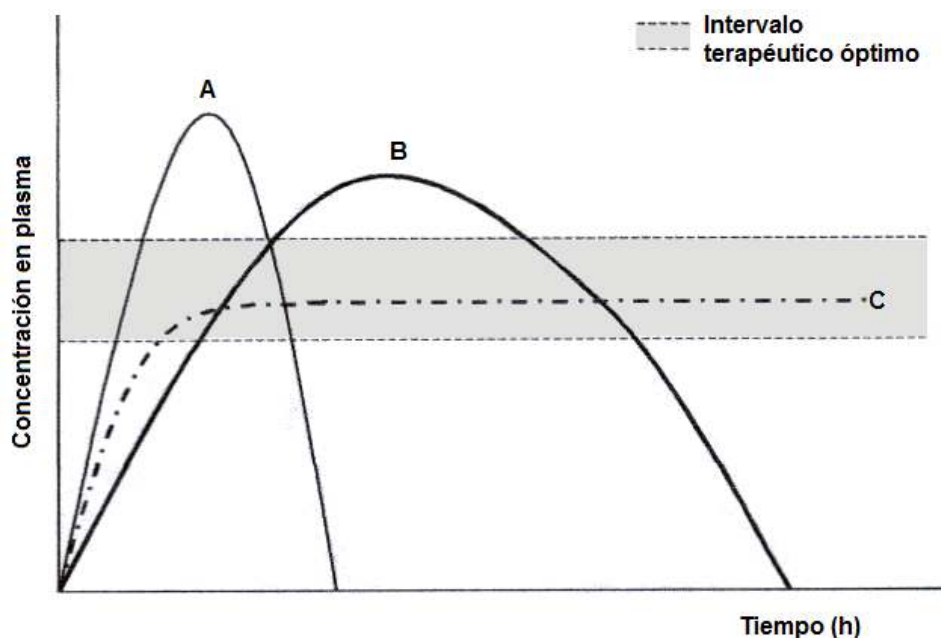


Figura 10. Curvas de concentración del principio activo en plasma vs. tiempo para un intervalo terapéutico estrecho. (A) y (B) sistemas convencionales para la entrega de fármacos, (C) sistema de liberación controlada.

Debido a la biodegradabilidad y biocompatibilidad del quitosano, la obtención de hidrogeles a partir de este biopolímero es una alternativa atractiva en la que se espera que no haya ningún tipo de reacción adversa, en comparación con los hidrogeles de origen sintético, en los cuales existe un inminente riesgo por la presencia de monómeros residuales altamente tóxicos. Una característica adicional de los hidrogeles de quitosano, es la sensibilidad que pueden tener estos frente al pH; debido a los grupos amino que se encuentran a lo largo de la cadena polimérica, se espera un mayor hinchamiento a valores de pH ácido en comparación con valores de pH alcalino.

Se pretende entonces hacer un estudio sobre hidrogeles de quitosano, utilizando como materia prima el quitosano extraído del micelio del hongo *Aspergillus niger*, el cual se encuentra libre de alérgenos.

4. JUSTIFICACIÓN

En estudios previos realizados en la Universidad del Valle (Cundumí *et al.*, 1994; Balanta *et al.*, 2010), se ha llevado a cabo la extracción de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger*. No obstante, en estos trabajos se reportaron rendimientos de extracción de 1.07-3.83%, lo cual ha hecho poco atractivo el micelio producido por la empresa Sucromiles S.A. para un proceso industrial de producción de quitosano. Sin embargo, de acuerdo a la ficha de técnica del micelio que se muestra en la Tabla 5, además de azúcares, lípidos, proteínas, polisacáridos y humedad, existe alrededor de un 15% de quitina, es decir que aún se pueden incrementar los rendimientos de la extracción de quitosano empleando el método más sencillo posible, en aras de hacer este proceso más atractivo para la industria colombiana.

Tabla 5. Ficha técnica del micelio producido por la empresa Sucromiles S.A.

Análisis	% p/p*
Proteína	11.0
Cenizas	1.95
Grasas	1.04
Calcio	0.30
Fósforo	0.09
Ácido cítrico	0.05
Quitina	14.7
Azucres	51.1

* En base seca.

Por otra parte, en la actualidad se reconoce el uso de polímeros en medicina como una práctica ampliamente extendida y en continuo desarrollo, ya que los polímeros no solo han reemplazado a otros materiales empleados (como piezas metálicas), sino que abrieron el campo a nuevas aplicaciones que antes eran difíciles de

alcanzar. Los hidrogeles específicamente han despertado gran interés para ser empleados como sistemas de liberación de fármacos o como membranas de hemodiálisis. Estos polímeros con una baja densidad de entrecruzamiento resultan entonces atractivos para la liberación de fármacos con problemas farmacocinéticos.

El grupo amino presente en el C-2 de cada unidad repetitiva del quitosano es tal vez el principal centro de reacción de este biopolímero. Gracias a su carácter nucleofílico se hace posible llevar a cabo reacciones de funcionalización y de entrecruzamiento. En este sentido, empleando moléculas difuncionales con un carácter electrofílico como dialdehídos y ácidos dicarboxílicos, se pretende obtener hidrogeles de quitosano extraído del hongo *Aspergillus niger*. Se espera además un hinchamiento selectivo al pH del medio, tomando como fundamento la protonación de los grupos aminos a pH ácido, lo cual generará repulsión de cargas positivas a través de la red, aumentando considerablemente el hinchamiento del material polimérico. A valores de pH básicos no se presentará este tipo de repulsiones por lo cual el material se debe mantener colapsado.

Con el fin de estudiar a fondo la aplicabilidad de los hidrogeles, se realizará la liberación controlada *in vitro* de fármacos hidrosolubles, bajo condiciones controladas de pH y temperatura. Adicionalmente se estudiará la biodegradabilidad de estos hidrogeles simulando condiciones fisiológicas en el laboratorio. De esta manera, en este proyecto se pretende obtener hidrogeles con una respuesta selectiva al pH, que combinen además las propiedades de un polímero biocompatible, biodegradable y con actividad antimicrobiana, proveniente de un recurso renovable y ampliamente disponible en la región.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Extraer quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger* generado por la empresa Sucromiles S.A. para sintetizar hidrogeles y estudiar su aplicabilidad en la liberación controlada de un fármaco.

5.2 Objetivos Específicos

- Optimizar a escala de laboratorio el proceso de extracción de quitosano proveniente del micelio generado en una planta productora de ácido cítrico.
- Caracterizar el quitosano obtenido mediante viscosimetría capilar, valoración potenciométrica, análisis elemental, resonancia magnética nuclear y espectroscopía infrarroja.
- Sintetizar hidrogeles de quitosano a través del entrecruzamiento químico de sus cadenas con moléculas difuncionales.
- Estudiar *in vitro* la cinética de hinchamiento de los hidrogeles a diferentes valores de pH.
- Estudiar *in vitro* la cinética de liberación controlada de un fármaco bajo condiciones controladas de pH y temperatura.
- Evaluar la degradabilidad de los hidrogeles de quitosano mediante la simulación de condiciones fisiológicas.
- Estudiar la biocompatibilidad de los hidrogeles de quitosano mediante pruebas piloto de implantación en un modelo animal.

6. METODOLOGÍA

6.1 Equipos

Espectrofotómetro UV-VIS 1700 PharmaSpec Shimadzu

Espectrofotómetro IR Thermo Scientific Nicolet 6700

RMN Bruker Avance II 400 MHz UltraShield

pH-metro CG820 Schott Gerate

Analizador elemental Thermo Flash EA 1112 series

Calorímetro diferencial de barrido TA Instruments 2920

Termobalanza TA Instruments 2050

Microscopio electrónico de barrido

Viscosímetro Ubbelohde con capilar 0C

International Centrifuge Universal Model UV

International Clinica Centrifuge Model CL

6.2 Reactivos

Micelio seco (10% humedad, Sucromiles S.A.); hidróxido de sodio (99%, Merck); ácido clorhídrico (37%, Panreac Química S.A.U); cloruro de sodio (99%, Aldrich); cloruro de potasio (99%, Merck); fosfato monobásico de potasio (99%, Merck); fosfato dibásico de potasio (98%, Merck); ácido acético glacial (99%, Sucromiles S.A.); etanol (96%, Sucromiles S.A.); éter etílico (99%, Sigma-Aldrich); glioxal (40%, Sigma-Aldrich); glutaraldehído (25%, Sigma-Aldrich); ácido succínico (99%, Sigma-Aldrich); ácido glutárico (99%, Aldrich); betahistina clorhidrato (99%, MK Tecnoquímicas). Todos los reactivos se usaron como se recibieron.

6.3 Estimación de la cantidad de quitina presente en el micelio de *Aspergillus niger*

Antes de iniciar el proceso de extracción de quitosano, se determinó la cantidad de quitina presente en la pared celular del micelio proveniente de la empresa Sucromiles S.A. Para ello se realizó la extracción del complejo quitina-glucano

utilizando la metodología descrita previamente en la literatura (Kogan *et al.*, 2003; Skori *et al.*, 2010). El micelio seco (100.10 g) se colocó en 500 mL de una solución de NaOH 1 M con agitación mecánica, durante 1 h a 60 °C. Posteriormente, el material insoluble en el medio alcalino se filtró y se lavó exhaustivamente con agua destilada (2.2 L), etanol al 96% (1.5 L) y finalmente con éter etílico (0.8 L), para luego colocarlo a secar en horno a 50 °C hasta obtener finalmente un sólido blanco (44.861 g); Este proceso se hizo por triplicado y a cada una de las muestras se le realizó un análisis elemental cuantitativo. Adicionalmente este complejo se caracterizó mediante RMN-¹⁵N en estado sólido empleando la rotación al ángulo mágico o MAS (Magic Angle Spinning) y polarización cruzada o CP (Cross Polarization).

6.4 Extracción de quitosano de micelio del hongo *Aspergillus niger*

6.4.1 Diseño experimental

De acuerdo a la Figura 11 se observa que el proceso de extracción de quitosano a partir del micelio de hongos, involucra fundamentalmente una etapa de hidrólisis básica y una de extracción con un ácido diluido que van acompañadas de pasos complementarios de filtración y lavado.

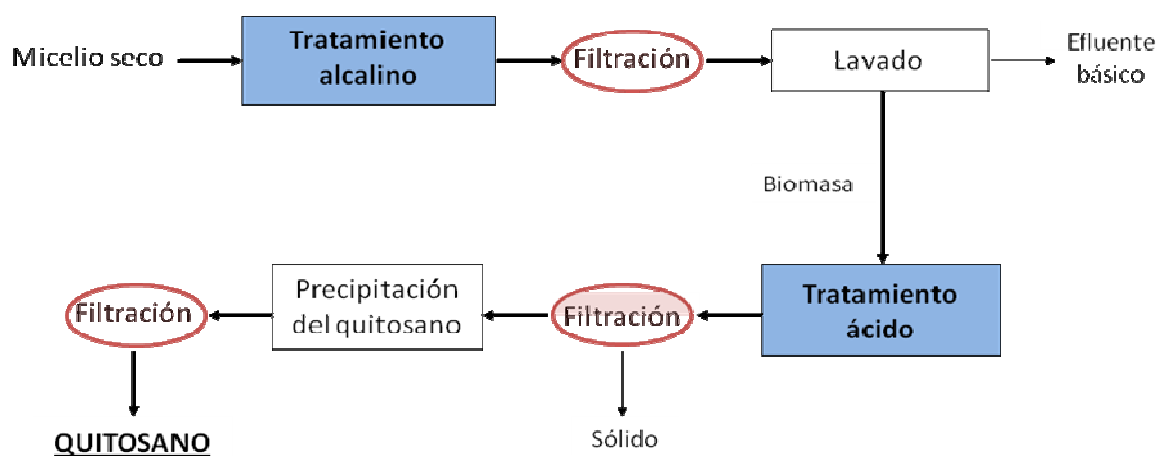


Figura 11. Diagrama de flujo del proceso de extracción de quitosano a partir de hongos.

En este proceso es evidente la presencia de múltiples variables que pueden modificar la eficiencia del proceso, por ejemplo las temperaturas de cada tratamiento, las concentraciones, los tiempos de cada proceso, entre otros. Por esta razón y teniendo en cuenta que en la literatura se reportan algunas metodologías con claras discrepancias para obtener quitosano, se realizó una optimización a escala de laboratorio empleando un diseño experimental de tipo factorial, tomando la concentración de hidróxido de sodio y el tiempo de reacción para el tratamiento básico como variables de control. Se presta especial atención al tratamiento básico porque es la etapa donde ocurre la destrucción de la pared celular, la liberación de la quitina del complejo quitina-glucano y la conversión a quitosano mediante la desacetilación. Para el tratamiento ácido se empleó ácido acético el cual se mantuvo a una concentración constante de 10% (v/v) a 100 °C durante 3 h. El rendimiento al final de la extracción fue tomado como la variable de respuesta para el diseño propuesto, el cual se describe mediante la siguiente ecuación:

$$N = m^n \times r \quad (\text{Ecuacion 1})$$

En donde N es el número de experimentos a realizar, m el número de niveles (4 en este caso), r el número de réplicas experimentales (2 para este proceso) y n el número de variables de control (2); de acuerdo a esto se realizaron 32 experimentos para encontrar las condiciones óptimas del proceso.

6.4.2 Influencia del tratamiento ácido en la extracción

Una vez encontradas las mejores condiciones para el tratamiento alcalino de la muestra mediante el diseño experimental descrito anteriormente, se realizó una segunda serie de ensayos empleando ácido clorhídrico al 1% (v/v) en lugar de ácido acético al 10% (v/v), con el fin de estudiar cómo influye la fuerza del ácido en el rendimiento de la extracción. Esta segunda serie de experimentos se realizó a dos temperaturas, inicialmente a 70 °C y luego se repitieron experimentos a 25 °C.

6.4.3 Extracción de quitosano con las mejores condiciones encontradas

Una vez establecidas las mejores condiciones para el proceso, se llevó a cabo la extracción de quitosano en repetidas ocasiones mediante la siguiente metodología: el micelio seco (100 g) fue lavado varias veces con agua para eliminar impurezas como ácido cítrico remanente y azúcares solubles en agua. Luego que la muestra se secó en un horno a 50 °C, se sometió a una hidrólisis básica empleando 500 mL de NaOH al 40% (p/v) (5 mL de solución por cada gramo de micelio) bajo agitación mecánica, a 110 °C durante 4 h. El material insoluble en el medio alcalino se filtró a gravedad y se lavó exhaustivamente con agua destilada (3 L) hasta alcanzar un pH alrededor de 8. La solución alcalina filtrada al momento de aislar el material insoluble luego de la reacción, se almacenó para una segunda hidrólisis básica. El sólido obtenido (alrededor de 40 g) se adicionó en 1.5 L de agua destilada y se acidificó adicionando gota a gota HCl al 37 % (p/v) hasta alcanzar un pH alrededor de 3 (3.5 mL en total). La mezcla se mantuvo con agitación mecánica, durante 3 h a temperatura ambiente. El sobrenadante del anterior paso se separó por centrifugación a 4500 rpm durante 10 min y se basificó con NaOH 30% (p/v) hasta alcanzar un pH de 10 (2 mL en total) para promover la precipitación del quitosano, el cual fue aislado finalmente mediante filtración al vacío en un embudo Buchner; a la biomasa obtenida de la centrifugación se le realizó una segunda extracción ácida.

El quitosano obtenido se lavó con agua destilada, etanol al 96% y acetona para eliminar las impurezas y el NaOH remanente. Finalmente, el sólido obtenido se colocó a secar en horno a 50 °C, obteniendo un sólido de color amarillo claro (6.91 g).

6.4.4 Extracción de quitosano en planta piloto

Las condiciones empleadas en el laboratorio se reprodujeron en un reactor de doble chaqueta equipado con baño de aceite y con capacidad para 10 L. Para cada ensayo se empleó 1000 g de micelio seco en 5 L de NaOH al 40% (p/v),

obteniendo 339 g del sólido insoluble en el medio alcalino. Para la extracción del quitosano en medio ácido se emplearon 4 L de HCl al 0.2% (v/v).

6.5 Caracterización del quitosano extraído

6.5.1 Caracterización espectroscópica

El quitosano se caracterizó mediante espectroscopia infrarroja empleando la pastilla de KBr. Posteriormente, se realizaron experimentos de RMN-¹H usando DMSO-d₆ como solvente acompañado por dos gotas de F₃CCOOH para disolver la muestra. Los experimentos de RMN se realizaron a una temperatura de 25 °C.

Adicionalmente, el quitosano se caracterizó mediante RMN-¹⁵N y RMN-¹³C en estado sólido con polarización cruzada y rotación al ángulo mágico (CP-MAS). Los experimentos de ¹³C se llevaron a cabo con una frecuencia de barrido de 29.8 kHz (pulso de 90° de 10 μs), el tiempo de contacto fue de 1 ms, el tiempo de adquisición de 50 ms y el tiempo de relajación de 1.1 s; se realizaron en total 1507 barridos para adquirir los espectros de ¹³C. Para los experimentos de ¹⁵N se usó una frecuencia de barrido de 24.4 kHz (pulso de 90° de 10 μs), el tiempo de contacto fue de 2 ms, el tiempo de adquisición de 50 ms y un tiempo de relajación de 1.4 s; se realizaron 4248 barridos para obtener los espectros de ¹⁵N. En todos los experimentos se empleó un rotor de circonio de 4 mm de diámetro con una frecuencia de rotación en el MAS (54.7°) de 5 MHz y una temperatura de 25 °C.

6.5.2 Grado de desacetilación del quitosano

Se determinó el grado de desacetilación del quitosano extraído mediante titulaciones potenciométricas y por análisis elemental cuantitativo. Para el análisis potenciométrico se disolvieron 0.5 g de quitosano en 20 mL de HCl 0.3 M, esta solución se tituló con NaOH 0.10 M, previamente estandarizado con ftalato ácido de potasio. Las mediciones de pH se realizaron gradualmente tras la adición de cada mililitro de NaOH hasta cuando el pH llegó a 12. Paralelamente se realizó el análisis elemental de tres muestras de quitosano extraído; el grado de

desacetilación se estimó teniendo en cuenta la relación carbono/nitrógeno para las unidades de N-acetilglucosamina remanentes en el polímero.

6.5.3 Determinación del peso molecular

El peso molecular promedio viscoso M_v del quitosano se determinó mediante viscosimetría capilar en un baño termostático a 25 °C. Las soluciones de quitosano se prepararon empleando una mezcla de ácido acético 0.1 M y cloruro de sodio 0.2 M siguiendo la metodología previamente reportada por Parada y colaboradores y aplicando posteriormente la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (Parada *et al.*, 2004; Kasaai, 2007).

6.5.4 Análisis térmico

Al quitosano aislado se le realizaron estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar su respectiva temperatura de transición vítrea y de descomposición. Las mediciones se llevaron a cabo con el biopolímero seco haciendo un primer barrido desde 20 hasta 110 °C a una velocidad de 10 °C/min y un segundo barrido desde 20 hasta 400 °C con la misma rampa de temperatura. También se estudió la estabilidad térmica del biopolímero mediante análisis termogravimétrico (TGA).

6.5.5 Difracción de rayos X

Se analizó el difractograma obtenido para el quitosano extraído mediante su comparación con una muestra de quitosano comercial.

6.6 Síntesis de hidrogeles de quitosano

Una vez se caracterizó el quitosano extraído, se sintetizaron hidrogeles mediante el entrecruzamiento químico de sus cadenas empleando dialdehídos y ácidos dicarboxílicos, variando los porcentajes de entrecruzamiento. La síntesis de los hidrogeles se llevó a cabo empleando un anillo de teflón con un diámetro interno de 5.5 cm y un espesor de 4 mm, en medio de dos placas de vidrio previamente silanizadas con dimetilclorosilano al 5% en tolueno seco. Las placas fueron

sujetadas con ganchos una vez se introdujo la mezcla de reacción como se muestra en la Figura 12. Este sistema permitió obtener hidrogeles con dimensiones regulares, lo cuales posteriormente eran cortados con un sacabocados de 7 mm de diámetro.



Figura 12. Dispositivo empleado para la síntesis de los hidrogeles.

6.6.1 Entrecruzamiento con dialdehídos

Se emplearon el glioxal y el glutaraldehído como agentes entrecruzantes. Para cada síntesis se usaron 10 mL de una solución de quitosano al 4% en ácido acético al 2%. Posteriormente, se adicionaron diferentes volúmenes de glutaraldehído al 2% para obtener porcentajes de entrecruzamiento de 25, 50, 75 y 100%. Luego de agitar la mezcla de reacción en un vortex por 30 segundos, se transfirió rápidamente al molde de teflón mostrado en la Figura 12; en algunos casos fue necesario eliminar las burbujas generadas durante la agitación en un sonicador antes de llevar la mezcla al molde. Transcurrida una hora de reacción se observó la gelificación de la solución; sin embargo, la reacción se dejó durante 24 h.

Para los hidrogeles con glioxal se usó la misma metodología descrita anteriormente. Sin embargo, para que el proceso de gelificación se diera, fue necesario adicionar 0.05 mL de NaOH 1.75 M durante la agitación de la mezcla de reacción en el vortex. Luego de esto la reacción se dejó durante 24 h. Una vez se retiraron las placas de vidrio silanizado, los hidrogeles se cortaron y lavaron con

agua destilada por un periodo de dos semanas para eliminar las moléculas de dialdehído que no reaccionaron. Finalmente, se secaron en horno a 50 °C hasta alcanzar un peso constante.

6.6.2 Entrecruzamiento con ácidos dicarboxílicos

En este caso se empleó el ácido succínico y el ácido glutárico como agentes entrecruzantes. Inicialmente, se preparó una solución de cada uno de los ácidos con una concentración de 0.38 M, y se ajustó el pH a 6.5 mediante la adición de pequeñas perlas de NaOH. Posteriormente, a la solución del ácido carboxílico correspondiente se le adicionó N-hidroxisuccinimida (NHS) en una relación 1:2 con respecto al ácido. La mezcla de reacción se llevó a 4 °C con la ayuda de un baño termostático e inmediatamente se adicionó la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) como agente de condensación en una relación 1:5 con respecto al ácido carboxílico. Pasados 5 minutos esta mezcla de reacción se adicionó sobre la solución de quitosano al 4% en ácido acético al 2% y se agitó durante 30 segundos en un votex, para finalmente transferirla al molde de teflón donde se dejó reaccionar durante 24 h a temperatura ambiente. Se emplearon los volúmenes necesarios de cada ácido carboxílico para obtener hidrogeles con porcentajes de entrecruzamiento del 25, 50, 75, y 100%. Transcurrido el tiempo de reacción los geles formados se cortaron y lavaron con agua destilada por un periodo de dos semanas.

6.7 Caracterización de los hidrogeles de quitosano

6.7.1 Caracterización espectroscópica

Los hidrogeles sintetizados se caracterizaron en estado seco mediante espectroscopia infrarroja, empleando la pastilla de KBr.

6.7.2 Micrografía electrónica de barrido

Mediante la técnica de microscopia electrónica de barrido se estudió la superficie del material obtenido y se comparó con el material de partida.

6.7.3 Análisis térmico

Mediante el análisis térmico de los hidrogeles obtenidos con el quitosano extraído, se determinó las respectivas temperaturas de degradación.

6.8 Cinética de hinchamiento de los hidrogeles

Para los estudios cinéticos de hinchamiento los hidrogeles se llevaron al estado xerogel y previamente pesados se sumergieron en soluciones acuosas a diferentes valores de pH. El estudio cinético se realizó empleando 100 mL del medio de hinchamiento a una temperatura de 37 °C, la cual era controlada mediante un baño termostático. El proceso de hinchamiento se siguió mediante el incremento en el peso del hidrogel con respecto al tiempo. Antes de realizar cada una de estas mediciones, el hidrogel se sacaba del medio y se secaba con papel secante para eliminar el exceso de solución de la superficie. Los tiempos de pesado para cada muestra en minutos fueron: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 290, 320, 350, 380, 410, 440, 470, 500, 530, 560, 590. En los días posteriores se tomaron tres pesos al día, en la mañana, al medio día y en la tarde, hasta cuando no se presentaron variaciones considerables en el peso de cada pastilla, punto en el cual se alcanza el equilibrio de hinchamiento.

Los experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las muestras, y se usó un pH ácido (pH 3), un pH fisiológico obtenido mediante buffer de fosfatos (pH 7.4) y un pH básico (pH 11).

El grado de hinchamiento (W) y el contenido de agua (H) se calcularon mediante las expresiones matemáticas 2 y 3 respectivamente.

$$W = \left[\frac{\text{peso húmedo} - \text{peso seco}}{\text{peso húmedo}} \right] \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$H = \left[\frac{\text{peso húmedo} - \text{peso seco}}{\text{peso seco}} \right] \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

6.9 Cinética de liberación *in vitro* de un fármaco modelo

6.9.1 Incorporación del fármaco en el hidrogel

La incorporación del fármaco en los hidrogeles se realizó mediante el proceso físico de hinchamiento del material polimérico. Para ello las pastillas en estado xerogel se introdujeron en una disolución acuosa de betahistina 1.0 M en ausencia de luz para evitar su degradación y a temperatura ambiente durante una semana, tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio de hinchamiento. La solución del fármaco se preparó con una solución buffer de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ajustada a pH de 7.4.

6.9.2 Estudios cinéticos de liberación

Una vez se cargaron los hidrogeles con el fármaco se procedió a realizar los estudios de liberación. Estos se hicieron desde las pastillas hinchadas, a 37.0 ± 0.1 °C, empleando como medio de liberación 100 mL de solución buffer a pH de 7.4 y con agitación constante a 100 rpm; para que la pastilla no se desplazara en la solución se colocó sobre un soporte plástico. El seguimiento de la liberación se realizó tomando alícuotas del medio en distintos intervalos de tiempo y determinando la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a 222 nm donde el fármaco presentaba la máxima absorbancia. Los tiempos para cada medición en minutos fueron: 10, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 390, 420, 450, 480, 510 y al día siguiente tres mediciones (mañana, medio día y tarde) hasta alcanzar el equilibrio (concentración constante); una vez se realizaba la medición se devolvía la alícuota al medio para mantener el volumen constante.

6.10 Ensayos de degradación hidrolítica

A los hidrogeles sintetizados se les realizó un estudio de degradación hidrolítica empleando una solución reguladora de fosfatos a pH 7.4 y 37 °C según la norma ASTM F 1635-04a. La solución reguladora se preparó empleando NaCl 0.137 M, KCl 2.7×10^{-3} M, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.0×10^{-2} M y KH_2PO_4 2.0×10^{-3} M.

Los hidrogeles secos se depositaron en tubos con tapa que contenían la solución reguladora y se colocaron en incubadora a 37 °C por un periodo de 31 días. Las muestras fueron retiradas los días 2, 5, 8, 12, 16, 20, 24, 28 y 31, lavadas con agua destilada y secadas en horno a 60 °C hasta cuando el peso de la muestra fue constante. La pérdida de peso W_d (%) de la muestra se calculó empleando la Ecuación 4, donde W_i representa el peso inicial de la muestra seca y W_f es el peso final de la muestra seca luego de la degradación.

$$W_d = \left[\frac{W_i - W_f}{W_i} \right] \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

6.11 Estudios de biocompatibilidad *in vivo*

Para evaluar el comportamiento de los hidrogeles de quitosano en condiciones biológicas reales, se realizó la implantación subcutánea de los materiales en conejos (*Oryctolagus cuniculus*), machos, raza New Zealand, con una edad aproximada de 6 meses, y un peso entre 1600 y 2100 g. El protocolo de manejo del animal, quirúrgico y eutanásico fue aprobado por el comité de ética de la Universidad del Valle.

6.11.1 Procedimiento pre-quirúrgico

En la fase pre-quirúrgica los conejos fueron vacunados con 0.2 miligramos de Ivermectina al 1% subcutáneo. Se evaluaron las condiciones de salud de los animales, tomando registros de temperatura corporal, peso y consumo de alimento. Se observó también el acicalamiento, mantenimiento del hábitat,

posiciones en reposo y alerta por parte del animal conforme a la norma ISO 10993-6 8.5.3 (Animals and Implantation).

6.11.2 Procedimiento quirúrgico

Para la fase quirúrgica, los animales fueron sedados con tranquilan (0.3 mL/kg, Laboratorios Zoo), xilasyn 2 (0.4 mL/kg, Laboratorios Synthesis) y ketamina 50 (0.5 mL/kg, Holliday Scott) en una dosis única vía parenteral. Una vez anestesiado el animal (aproximadamente 10 min después), se preparó el campo quirúrgico mediante rasurado y desinfección con iodopovidona (Figura 13-A). Posteriormente, con un bisturí Bard/Parker No 3, hoja No 11, se realizó una incisión longitudinal de 2 cm en el lado izquierdo de la cadera y se separaron cuidadosamente los tejidos para crear dos bolsas subcutáneas (Figura 13-B). En cada bolsa se implantó una muestra de hidrogel de quitosano (Figura 13-C). A cada conejo se le implantó en el lado derecho una membrana de colágeno como muestra de control; en total se emplearon 5 conejos para la prueba piloto.

Finalmente, la incisión fue suturada con material reabsorbible vicryl®, con la técnica de puntos simples (Figura 13-D). Como procedimiento post-quirúrgico el animal fue tratado con clorhidrato de tramadol (0.25 mg, analgésico intramuscular) y penicilina procaínica 400000 UI (antibiótico intramuscular). El área suturada fue protegida con gentamicina como antibiótico tópico.

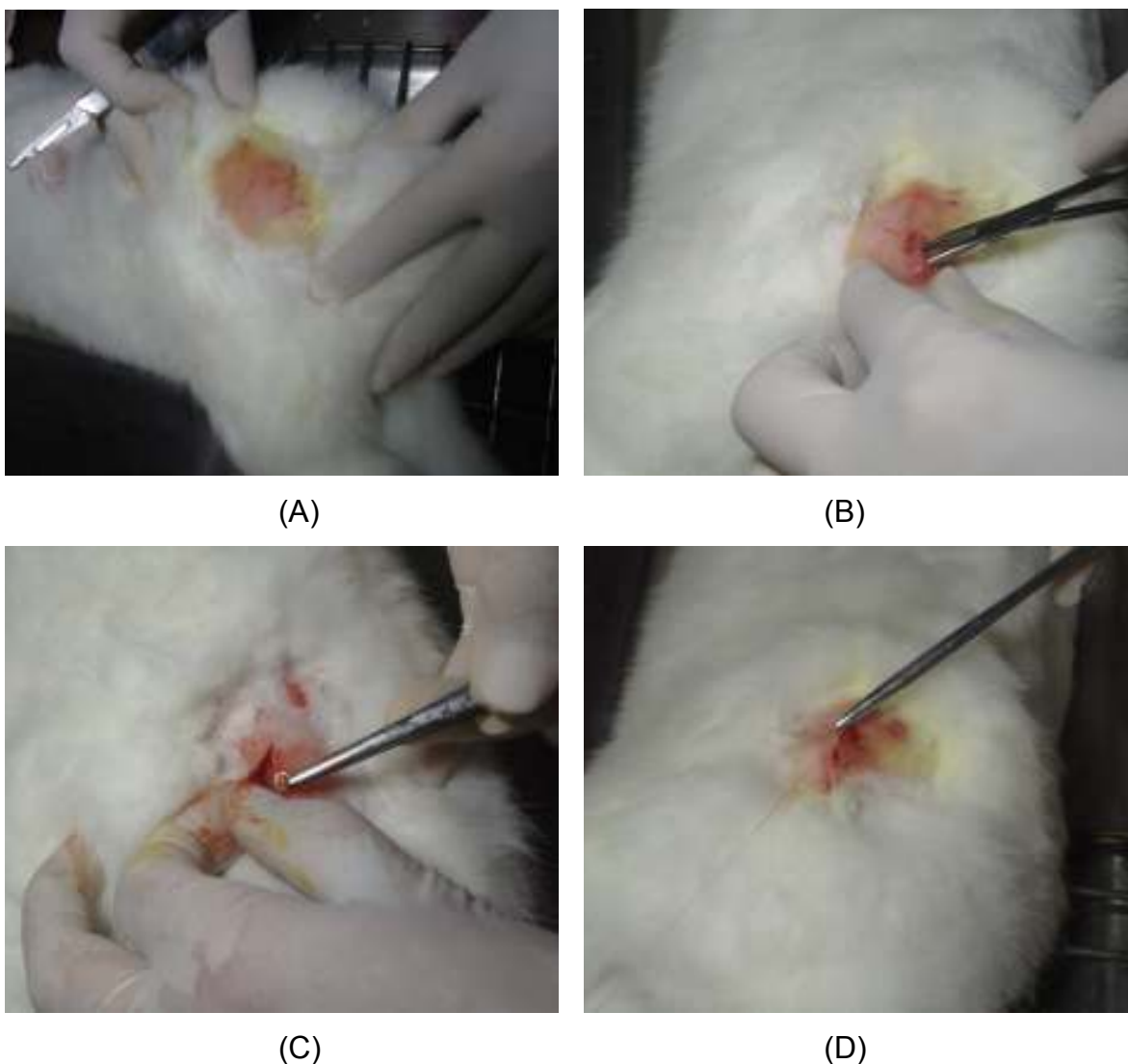


Figura 13. Implantación de hidrogeles en el modelo animal. (A) Preparación del campo quirúrgico, (B) disección de la epidermis, (C) inserción del material polimérico y (D) sutura de la incisión.

6.11.3 Eutanasia y recuperación de las muestras

Los animales fueron sacrificados a los 21 días de estudio utilizando una sobredosis de barbitúricos (Clorhidrato de Ketamina 1 mg,) aplicada intramuscularmente, seguida de una inyección intravenosa de Eutanax® (Pentobarbital Sódico y Fenilhidantoína, 1 mL/5 kg). Las muestras fueron removidas con el tejido conectivo circundante y se conservaron en formol al 10%. Finalmente para el estudio histológico se empleó hematoxilina-eosina como método de tinción.

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1 Estimación de la cantidad de quitina presente en el micelio de *Aspergillus niger*

El micelio de los hongos está compuesto principalmente por pared celular acompañada de algunos núcleos celulares presentes en menor proporción. Es bien conocido que la pared celular del hongo *Aspergillus niger* se compone de quitina y glucanos (Tabla 1). La quitina se encuentra unida física y covalentemente a una matriz de glucanos, que cumplen funciones inmunológicas en el hongo. Además de estos polisacáridos, en la pared celular se encuentran presentes algunos fosfolípidos, proteínas y ADN, que son biomoléculas fundamentales para la vida del hongo. De acuerdo a lo anterior, es posible realizar una estimación de la cantidad de quitina presente en la pared celular del micelio, eliminando las biomoléculas mencionadas anteriormente hasta dejar solamente el complejo quitina-glucano (CQG).

Mediante el tratamiento básico a 60 °C durante una hora, se logra hidrolizar las proteínas y saponificar los lípidos. La degradación se hace evidente experimentalmente por el empardeamiento de la mezcla de reacción. El sólido insoluble en el medio alcalino fue aislado y lavado hasta obtener un sólido blanco como el que se muestra en la Figura 14. En la Tabla 6 se muestran los resultados del análisis elemental realizado a cada una de las muestras obtenidas.

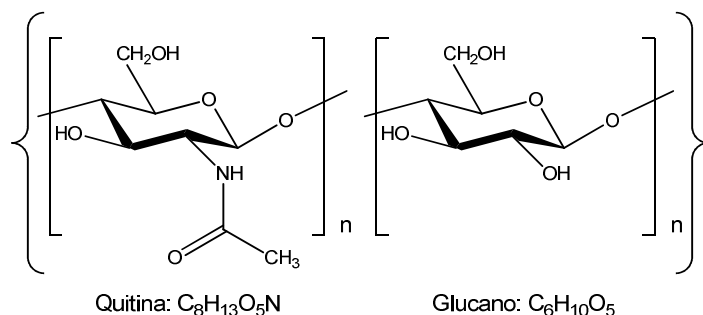
Tabla 6. Análisis elemental para tres muestras del complejo quitina-glucano (CQG).

Muestra No.	Cantidad de CQG recuperado (g)	% N	% C	% H
1	44.8613	1.75	35.06	5.36
2	47.5598	1.70	32.38	4.92
3	43.3345	1.74	32.52	5.68



Figura 14. Complejo quitina-glucano aislado del hongo *Aspergillus niger*.

Una vez se han eliminado las proteínas del micelio, la única fuente de nitrógeno será la quitina como se puede observar en el Esquema 10. Por lo tanto, un contenido de nitrógeno promedio del 1.73% representa un contenido de quitina del 27.23%. Como de este complejo se aislaron alrededor de 45.25 g (partiendo de 100 g de micelio), se puede decir finalmente que el micelio del hongo *Aspergillus niger* contiene un 12.32% de quitina. Este valor es comparable frente a un 11% de quitina reportado por Heux y colaboradores, usando RMN como método de cuantificación en muestras de *Aspergillus niger* producido por la compañía belga Gesval (Heux *et al.*, 2000).



Esquema 10. Estructura y fórmula molecular del complejo quitina-glucano.

Para garantizar que la cuantificación tenga validez es importante demostrar que no se ha realizado la desacetilación de la quitina, y poder usar las fórmulas moleculares del anterior esquema. El espectro RMN- ^{15}N de la Figura 15 fue tomado para una de las muestras del CQG en estado sólido. En este se observa únicamente una señal a 126 ppm que corresponde a los grupos amida presentes

en el C2 de la quitina. No se observa la señal característica de los grupos amino que representaría el proceso de desacetilación y aparecerían alrededor de 20 ppm.

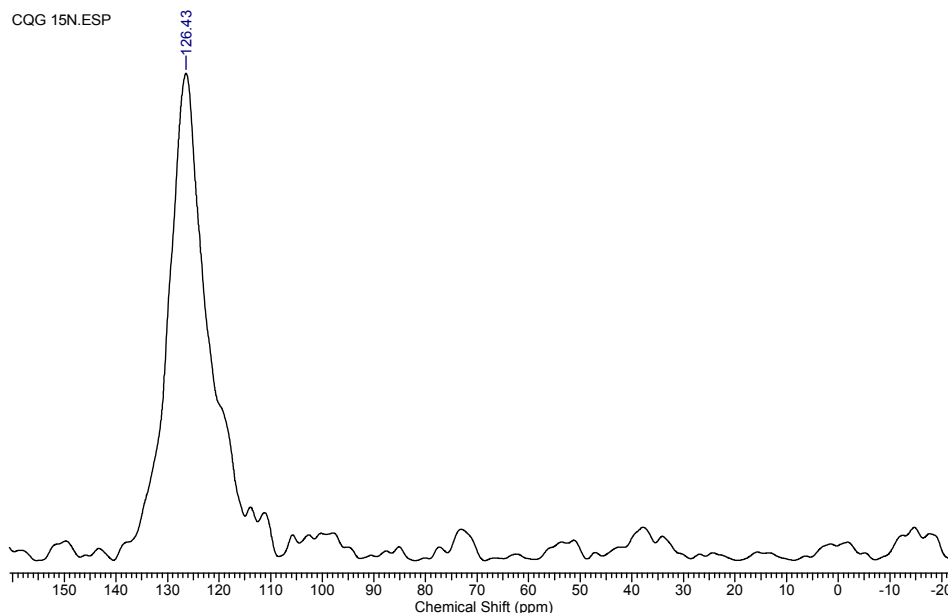
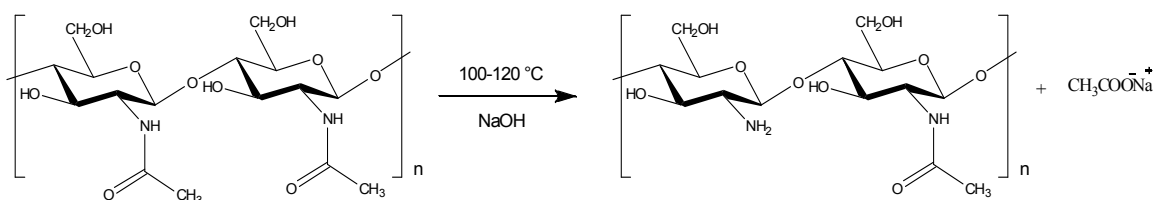


Figura 15. Espectro RMN-¹⁵N CP-MAS del complejo quitina-glucano.

7.2 Optimización de la extracción de quitosano

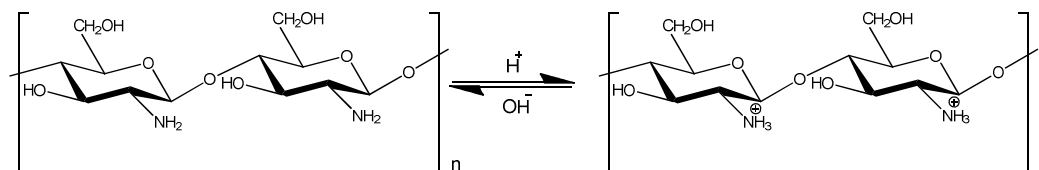
Mediante el tratamiento del micelio en condiciones fuertemente alcalinas a una elevada temperatura se logra destruir la pared celular y se promueve la degradación de las proteínas presentes en el medio. Luego de este paso el complejo quitina-glucano se disocia liberando la quitina, la cual a su vez es convertida en quitosano mediante el proceso de desacetilación que se muestra en el Esquema 11.



Esquema 11. Reacción de desacetilación de la quitina en medio básico.

En esta primera etapa el quitosano y los glucanos permanecen insolubles en el medio alcalino, y son aislados mediante procesos de filtración o centrifugación.

Una vez el material insoluble es separado y lavado con agua destilada para eliminar el exceso de NaOH, el quitosano es extraído a través de su disolución en un medio ácido, lo cual promueve la protonación de los grupos amino a lo largo de las cadenas poliméricas como se muestra en el Esquema 12.



Esquema 12. Protonación y desprotonación del quitosano durante la etapa final de extracción.

Finalmente, el quitosano en solución se puede recuperar mediante su precipitación en medio básico. Este proceso de extracción resulta bastante sencillo frente a la extracción de quitosano a partir de los subproductos derivados de la industria alimenticia marina, como camarones, cangrejos, langostas y calamares, en donde hay que usar pasos adicionales para eliminar residuos cárnicos y minerales. Además, los residuos de las fuentes marinas se caracterizan por ser materiales persistentes, que generan patógenos que ponen en riesgo la salud humana y aumentan la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) en ríos y océanos (Islam *et al.*, 2004; Beaney *et al.*, 2005). Sin embargo, la extracción de quitosano a partir de hongos es un proceso que presenta rendimientos inferiores a los obtenidos con derivados del mar, siendo esta su principal desventaja.

En trabajos previos sobre la extracción de quitosano a partir del micelio de la misma fuente, se han reportado rendimientos del 1-3%. No obstante, la estimación del contenido de quitina mostró que hay alrededor de 12 g de quitina por cada 100 g de micelio, lo que representa teóricamente hasta un 9.51% de quitosano. Se construyó entonces un diseño experimental de tipo factorial, con el fin de encontrar condiciones óptimas, que permitan obtener la mayor cantidad de quitosano al menor costo posible; en otras palabras hacer más atractivo este subproducto industrial altamente disponible en la región, como fuente industrial de quitosano.

Dentro de la optimización se mantuvieron constantes los siguientes parámetros: cantidad de micelio seco (50 g), volumen de solución de NaOH (250 mL) y temperatura de reacción (110 °C). Para el tratamiento ácido se adicionó ácido acético al 10% hasta alcanzar un pH alrededor de 3.5, la mezcla se dejó durante 3 h a 100 °C. Finalmente, para precipitar el quitosano se adicionó NaOH al 30% hasta alcanzar un pH de 11. En la Tabla 7 se observan los rendimientos obtenidos para el diseño experimental planteado, tomando como variables el tiempo de reacción y la concentración de NaOH.

Tabla 7. Diseño experimental factorial para la optimización de la extracción de quitosano.

Corrida	NaOH (%p/v)	Tiempo (h)	Rendimiento* (%)
I	20	2	0.49
II		3	0.60
III		4	0.74
IV		5	0.80
V	30	2	0.58
VI		3	0.70
VII		4	0.83
VIII		5	0.80
IX	40	2	1.44
X		3	1.82
XI		4	2.03
XII		5	1.91
XIII	50	2	1.50
XIV		3	1.70
XV		4	1.99
XVI		5	1.90

* Con base al micelio seco.

Los valores de la anterior tabla se pueden analizar mejor mediante la gráfica de barras de la Figura 16, en donde se observa claramente cómo el rendimiento de la

extracción aumenta cuando se tienen concentraciones de NaOH alrededor de 40 y 50%. Como no existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos para estas dos concentraciones, se toma la menor de ellas con el ánimo de disminuir los costos. Igualmente, para estas concentraciones se observa un mayor rendimiento en los tiempos prolongados; sin embargo, el proceso se ve desfavorecido cuando se realiza por 5 h. Posiblemente la exposición prolongada del polímero en el medio fuertemente alcalino promueve la degradación del mismo. Se toman entonces como condiciones óptimas de extracción una concentración de NaOH del 40% durante 4 h a 110 °C.

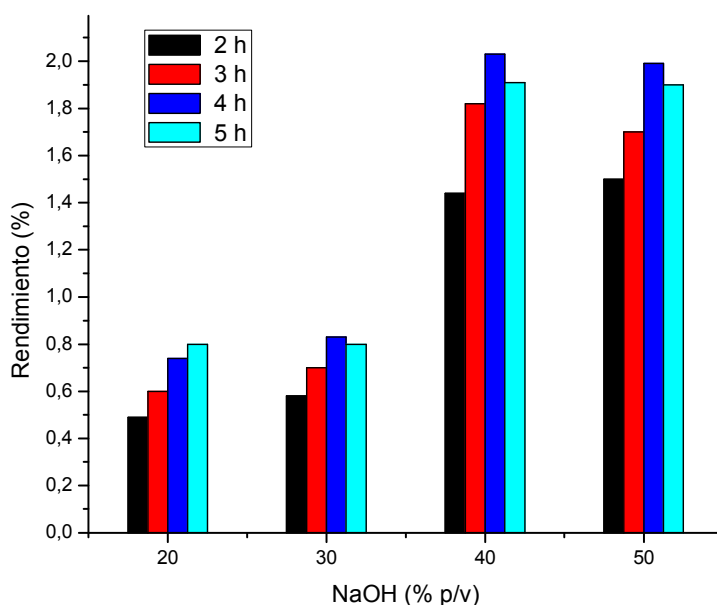


Figura 16. Resultados del diseño experimental empleado.

Las condiciones encontradas en el tratamiento alcalino son similares a los resultados reportados previamente en la literatura (Cundumí *et al.*, 1994; Balanta *et al.*, 2010), el rendimiento continúa siendo del orden del 2% de un 9.51% posible teórico. Se estudió entonces la influencia del ácido en la segunda etapa del proceso; para ello se tomó un tiempo de 4 horas para la hidrólisis básica y se repitieron las extracciones usando ácido clorhídrico al 1% (v/v) en lugar de ácido

acético al 10% (v/v) para alcanzar el pH de 3.5. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 17, donde se observa cómo el ácido mineral mejoró considerablemente el proceso de extracción al aumentar el rendimiento hasta un 5% cuando se emplea NaOH al 40% en la etapa inicial. Vale la pena mencionar que al usar HCl se requirió un menor volumen para llevar el pH a 3.5 en comparación a las cantidades requeridas con el ácido carboxílico, esto representa entonces una disminución de costos.

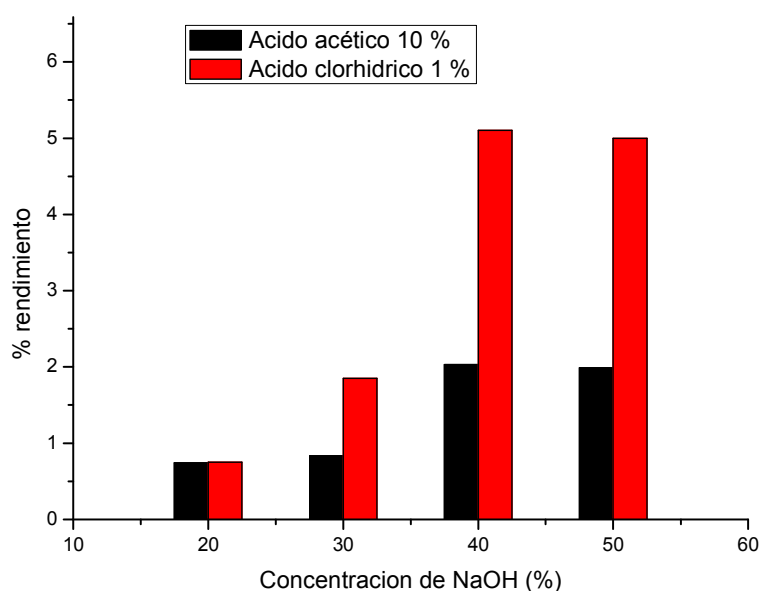


Figura 17. Influencia del ácido en el proceso de extracción de quitosano.

Para obtener los resultados que se muestran en la Figura 17, el HCl diluido se usó a una temperatura de 70 °C. Como este ácido es demasiado fuerte es muy probable que además de favorecer la separación del quitosano, promueva la hidrólisis de los enlaces glucosídicos del polisacárido a extraer, produciendo oligómeros de glucosamina. Por esta razón se realizaron dos ensayos en los cuales el tratamiento ácido se realizó durante 3 horas, a temperatura ambiente con agitación mecánica. Bajo estas últimas condiciones el rendimiento se elevó a un 7%, con la ventaja de tener un ahorro energético en la segunda etapa del proceso. Finalmente, en el diagrama de bloques de la Figura 18 se observan las condiciones usadas para la extracción de quitosano partiendo de 100 g de micelio

seco. Para alcanzar el máximo rendimiento obtenido hasta el momento, fue necesario someter la biomasa que se obtiene del tratamiento alcalino a un doble tratamiento ácido como se observa en la Figura 18. Para disminuir al máximo los costos del proceso, el efluente obtenido luego de la hidrólisis básica se usó para una segunda extracción, es decir que 500 mL de NaOH al 40% se pueden usar para tratar hasta 200 g de micelio.

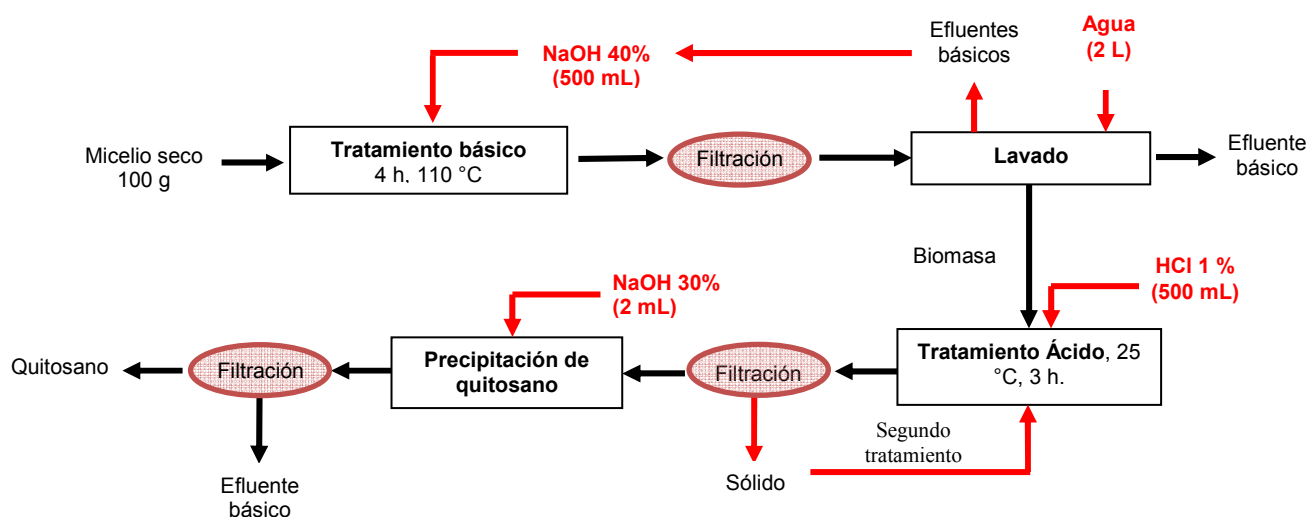


Figura 18. Diagrama de bloques para el proceso de obtención de quitosano.

El quitosano obtenido se purificó solubilizándolo en ácido acético al 2%, los sólidos en suspensión correspondientes a los glucanos que se alcanzaron a pasar en el proceso, fueron aislados mediante centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, el polímero se precipitó adicionando NaOH al 30% (p/v), se filtró al vacío y se lavó con agua y etanol.

7.3 Caracterización del quitosano

7.3.1 Espectroscopía infrarroja

En la Figura 19 se muestra el espectro IR de una muestra de quitosano extraído (línea roja) y una muestra de quitosano comercial (línea negra), en ambos espectros se observan las mismas bandas características para este compuesto; a

3460 cm^{-1} se observa una banda ancha que corresponde al estiramiento de los grupos hidroxilos (-OH), en esta misma región está solapada la vibración de tensión de los grupos amino (-NH₂); a 2921 cm^{-1} aparece la banda de estiramiento de los enlaces C-H alifáticos. La banda de estiramiento del grupo carbonilo (-C=O) aparece a 1655 cm^{-1} , la cual es conocida como banda I para amidas y en 1592 cm^{-1} se observa la vibración de deformación del enlace N-H, conocida como banda II para las amidas. También se observan las bandas de torsión para el grupo metileno (-CH₂-) a 1422 cm^{-1} ; a 1370 cm^{-1} se observa la vibración de los enlaces libres N-H. Las bandas de absorción observadas a 1079 cm^{-1} y 895 cm^{-1} corresponden a la vibración de los enlaces C-O-C, estas bandas fueron observadas previamente en la literatura (Nwe *et al.*, 2008) y confirman la unión de los monómeros mediante enlaces β -glucosídicos.

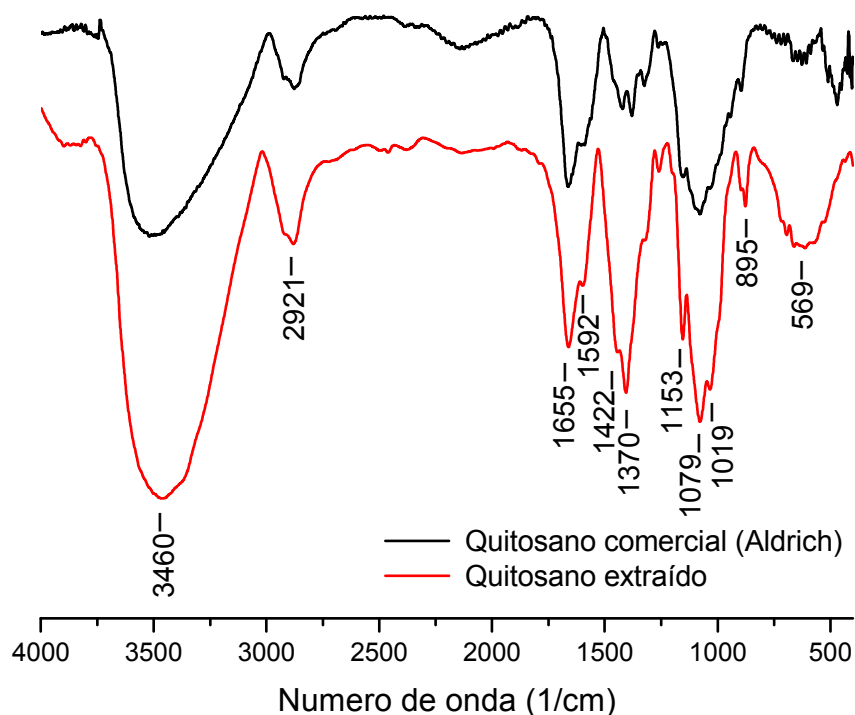


Figura 19. Espectro FTIR del quitosano extraído y el comercial.

7.3.2 Resonancia magnética nuclear

En el espectro de resonancia magnética protónica que se muestra en la Figura 20 se observa un singulete localizado a 2.07 ppm correspondiente a los protones del grupo acetamida ($-\text{COCH}_3$); a 2.88 ppm aparecen los protones de C2 de la fracción glucosamina; entre 3.47 y 3.68 ppm se observan la señales correspondientes a los protones de C3-C6 para las fracciones de D-glucosamina y N-Acetil-glucosamina; finalmente a 4.76 ppm se observa el protón de C1 para la D-glucosamina. Esta asignación se hace de acuerdo a trabajos reportados previamente en la literatura (Abdou *et al.*, 2008; Kumirska *et al.*, 2010). La señal correspondiente al solvente deuterado aparece a 2.50 y 3.28 ppm.

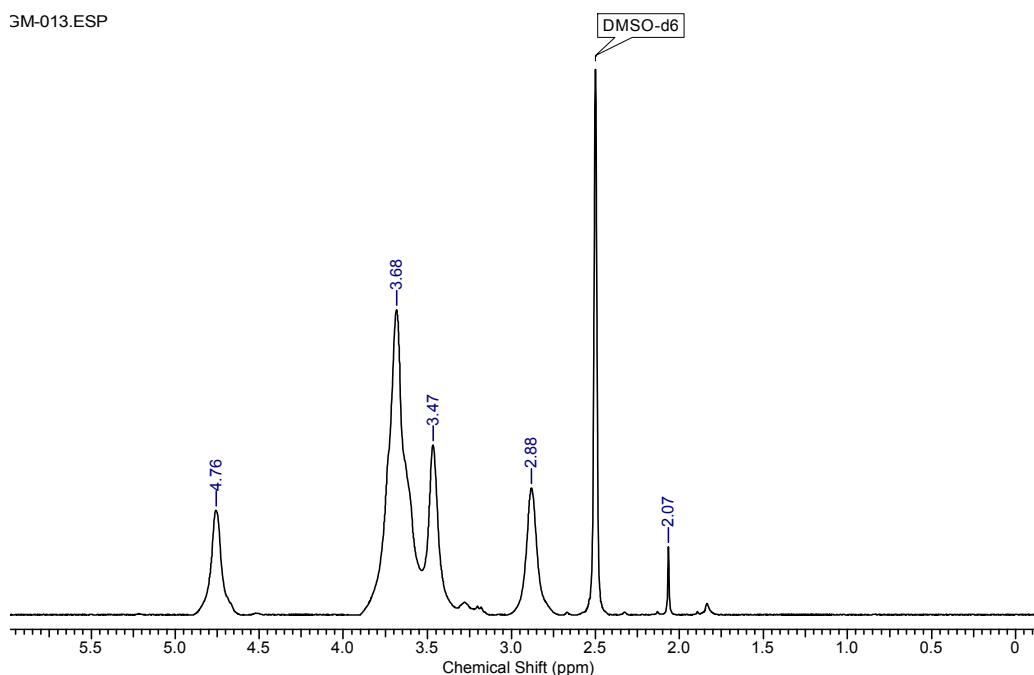


Figura 20. Espectro ^1H -RMN del quitosano extraído en DMSO-d_6 y CF_3COOH a 25 °C.

En la Figura 21 se observa el espectro $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ tomado en estado sólido, en el cual aparecen señales anchas con algunas señales solapadas. Esto revela la pérdida de cristalinidad cuando se desacetila la quitina, en la cual existe una gran cantidad de enlaces de hidrógeno que mantienen un ordenamiento estructural. En la Tabla 8 se asignan los diferentes desplazamientos químicos observados en el espectro.

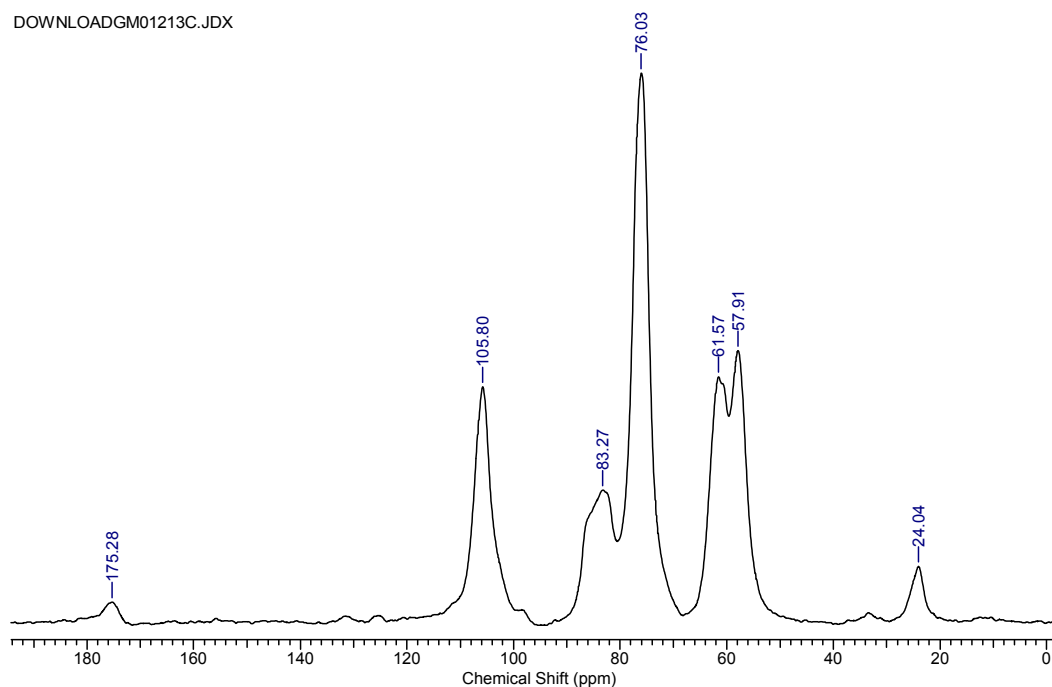


Figura 21. Espectro RMN- ^{13}C CP-MAS para el quitosano extraído.

Tabla 8. Desplazamientos químicos del quitosano obtenidos por RMN- ^{13}C CP-MAS.

	δ (ppm)
C=O	175.28
C1	105.80
C4	83.27
C5	76.03
C3	76.03
C6	61.57
C2	57.91
CH ₃	24.04

Para completar la caracterización del quitosano extraído, se tomó un espectro RMN- ^{15}N (Figura 22). En éste se observa principalmente la señal correspondiente al grupo amino alrededor de 29 ppm, y una señal muy débil a 127 ppm perteneciente a los grupos acetamida remanentes en las unidades acetiladas. Al comparar con el espectro del complejo quitina-glucano se hace evidente el proceso de desacetilación.

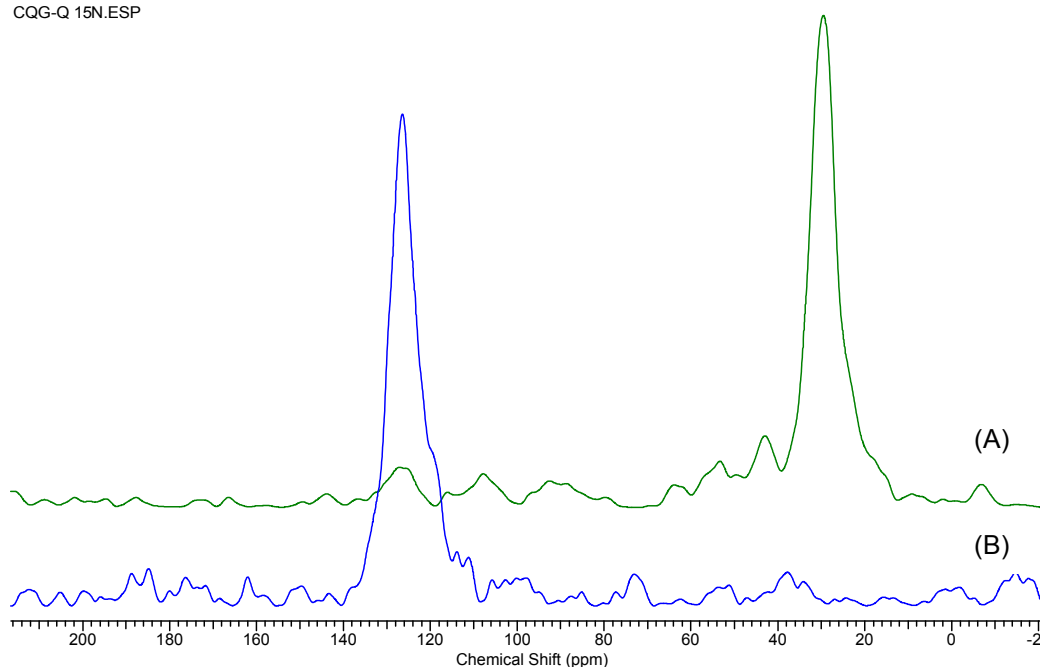


Figura 22. Espectro RMN- ^{15}N CP-MAS para (A) quitosano extraído y (B) complejo quitina-glucano.

7.3.3 Determinación del grado de desacetilación

La valoración potenciométrica del quitosano permitió obtener la gráfica de la Figura 23, en la cual al aplicar la primera derivada en cada uno de sus ejes se observan dos puntos de inflexión, el primero de ellos corresponde a la titulación del exceso HCl en el medio y el segundo a la valoración de los grupos NH_3^+ del quitosano extraído. Por lo tanto la diferencia entre los dos puntos de inflexión corresponde a la cantidad de HCl requerido para protonar los grupos amino del quitosano. El grado de desacetilación se calcula entonces mediante la Ecuación 5 que se muestra a continuación (Parada *et al.*, 2004; Dos Santos *et al.*, 2009).

$$\%DD = 100 - \frac{16.1(V_2 - V_1)M}{w} \quad (\text{Ecuación 5})$$

En la Ecuación 5, V_1 y V_2 representan el primer y segundo volumen de inflexión respectivamente, M es la molaridad de la solución de NaOH usada para la valoración y w el peso de la muestra de quitosano en gramos. De acuerdo con los

valores obtenidos de la gráfica, el quitosano presenta un grado de desacetilación promedio de 77.29%.

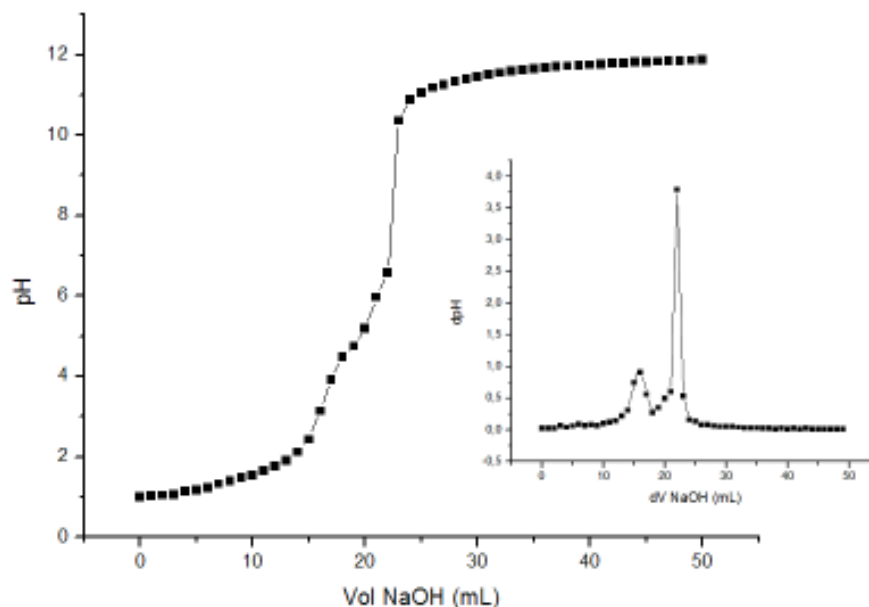


Figura 23. Valoración potenciométrica del quitosano para determinar el grado de desacetilación.

Por otra parte, a tres muestras de quitosano se les realizó un análisis elemental obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 9. Mediante la Ecuación 6 en la cual se tiene la relación C/N en la muestra de quitosano, se obtiene un grado de desacetilación promedio de 74.48% (Dos Santos *et al.*, 2009).

$$\%DD = 100 - \left(\frac{\frac{C}{N} - 5.145}{1.716} \right) * 100 \quad (\text{Ecuación 6})$$

Tabla 9. Análisis elemental de diferentes muestras de quitosano obtenido de *Aspergillus niger*.

Muestra	% C	% H	% N	C/N	%DD
1	38.38	7.52	6.86	5.594	73.79
2	37.84	7.13	6.82	5.548	76.49
3	39.07	6.95	6.97	5.605	73.16

7.3.4 Peso molecular promedio viscoso

Para determinar el peso molecular del quitosano mediante viscosimetría se calculó inicialmente la viscosidad específica (η_{sp}) del polímero empleando la Ecuación 7, donde η es la viscosidad de cada una de las soluciones preparadas y η_s la viscosidad del solvente empleado para el experimento.

$$\eta_{sp} = \frac{\eta}{\eta_s} - 1 \quad (\text{Ecuación 7})$$

Una vez calculado η_{sp} se usó en la ecuación de Huggins (Ecuación 8) para conocer la viscosidad intrínseca $[\eta]$ del quitosano; en la Ecuación 8 ρ_b representa la concentración de cada solución, K es la constante de Huggins y la relación η_{sp}/ρ_b es conocida como la viscosidad reducida.

$$\frac{\eta_{sp}}{\rho_b} = [\eta] + K[\eta]^2 \rho_b \quad (\text{Ecuación 8})$$

Al graficar la viscosidad reducida de cada solución en función de su concentración se obtiene la gráfica de la Figura 24.

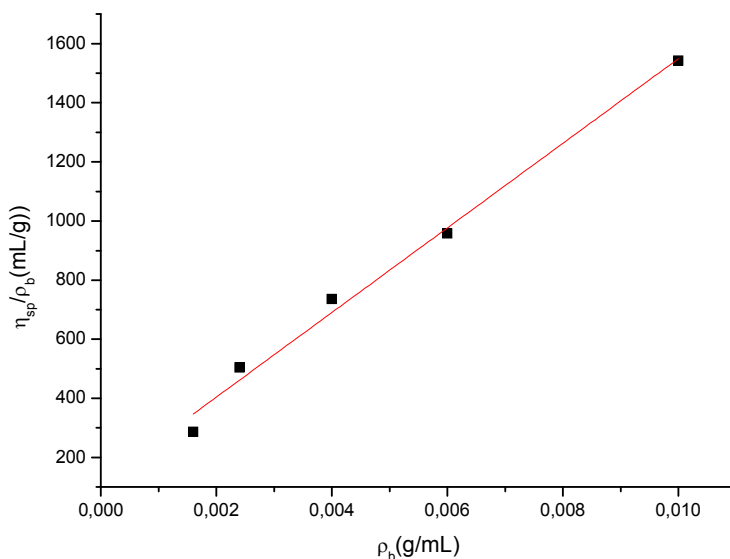


Figura 24. Viscosidad reducida de las soluciones de quitosano extraído con HCl a 70 °C en función de la concentración.

Haciendo la regresión lineal de la gráfica anterior y teniendo en cuenta la Ecuación 8, la viscosidad intrínseca de la muestra de quitosano es de 117.71 mL/g. Conociendo el valor de $[\eta]$ se puede emplear la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (Ecuación 9) para determinar el peso molecular del polímero.

$$[\eta] = K \left(\frac{M_v}{M_0} \right)^a \quad (\text{Ecuación 9})$$

En la Ecuación 9, K y a son las constantes dadas para determinado sistema polímero-solvente a determinada temperatura y se encuentran reportados previamente en la literatura. Para el caso específico del quitosano en las condiciones de estudio $K = 1.81 \times 10^{-3}$ mL/g y $a = 0.93$ (Kasaai *et al.*, 2007). De acuerdo a estos valores el quitosano extraído presenta un peso molecular M_v de 1.49×10^5 g/mol. Este valor corresponde a una muestra de quitosano extraída empleando HCl al 1% a 70 °C; sin embargo, como se mencionó en la sección 7.2 los mejores resultados se obtuvieron empleando este mismo ácido mineral a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Al hacer el análisis viscosimétrico para una muestra extraída a temperatura ambiente se obtuvo la gráfica de la Figura 25.

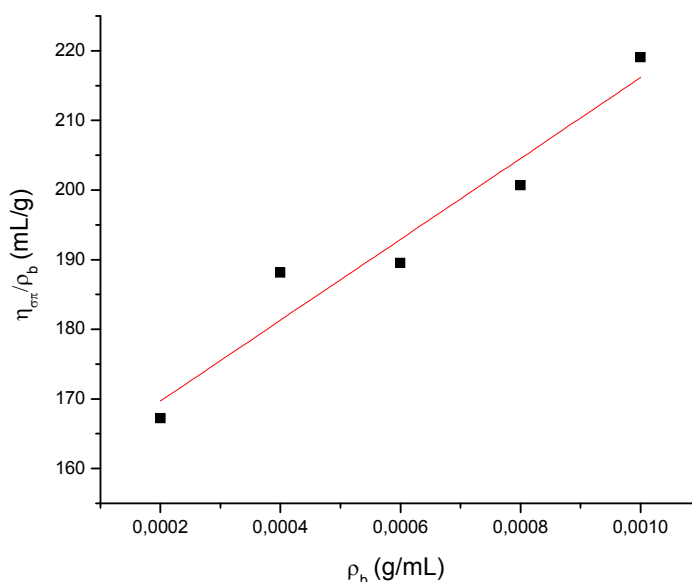


Figura 25. Viscosidad reducida de las soluciones de quitosano extraído con HCl a 25 °C en función de la concentración.

A partir de la anterior gráfica se obtuvo una viscosidad intrínseca de 150.86 mL/g, la cual corresponde a un peso molecular de 1.90×10^5 g/mol. En la Tabla 10 se resumen los resultados del análisis viscosimétrico y en estos se puede ver claramente cómo la temperatura promueve la depolimerización del quitosano mediante la ruptura de los enlaces glucosídicos en el medio fuertemente ácido. El quitosano en general se caracteriza por presentar pesos moleculares entre 1×10^5 y 5×10^5 g/mol (Majeti *et al.*, 2000), es decir que el quitosano extraído en este estudio se encuentra en el límite inferior y se puede clasificar como de bajo peso molecular.

Tabla 10. Influencia de la temperatura en el tratamiento con HCl al 1% en el peso molecular del quitosano obtenido.

Temperatura (°C)	$[\eta]$ (mL/g)	Mv (g/mol)
25	150.86	1.90×10^5
70	117.71	1.49×10^5

7.3.5 Análisis térmico

En la Figura 26 se muestran los resultados del análisis termogravimétrico para el quitosano, en el cual se observan tres pérdidas de peso importantes. La primera de ellas se presenta a 48 °C con una pérdida de peso de 8.5%, que corresponde a la evaporación de la humedad superficial presente en la muestra. A 266 °C se observa una pérdida de peso del 28%, mientras que a 322 °C se ha perdido el 50.1% del peso inicial de la muestra, estas dos disminuciones de peso son atribuidas a la degradación de la muestra de quitosano. Los valores obtenidos del TGA son comparables con resultados obtenidos previamente en la literatura para muestras de quitosano con %DD alrededor de 70%, donde además se ha podido encontrar una mayor estabilidad térmica en comparación con muestras con mayor grado de desacetilación (~97%) (Abdel-Fattah *et al.*, 2007).

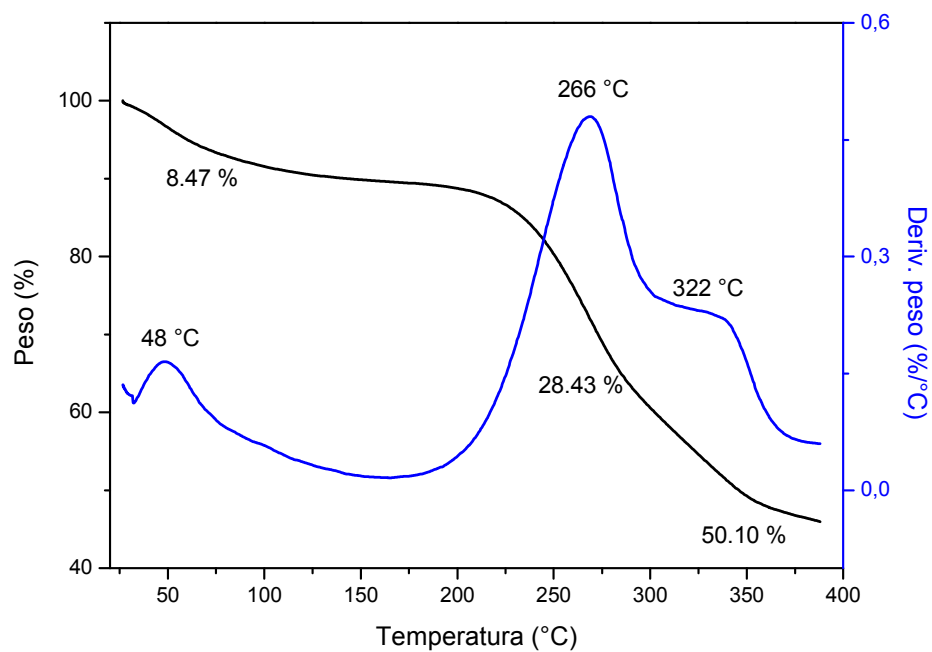


Figura 26. TGA obtenido para una muestra de quitosano extraído.

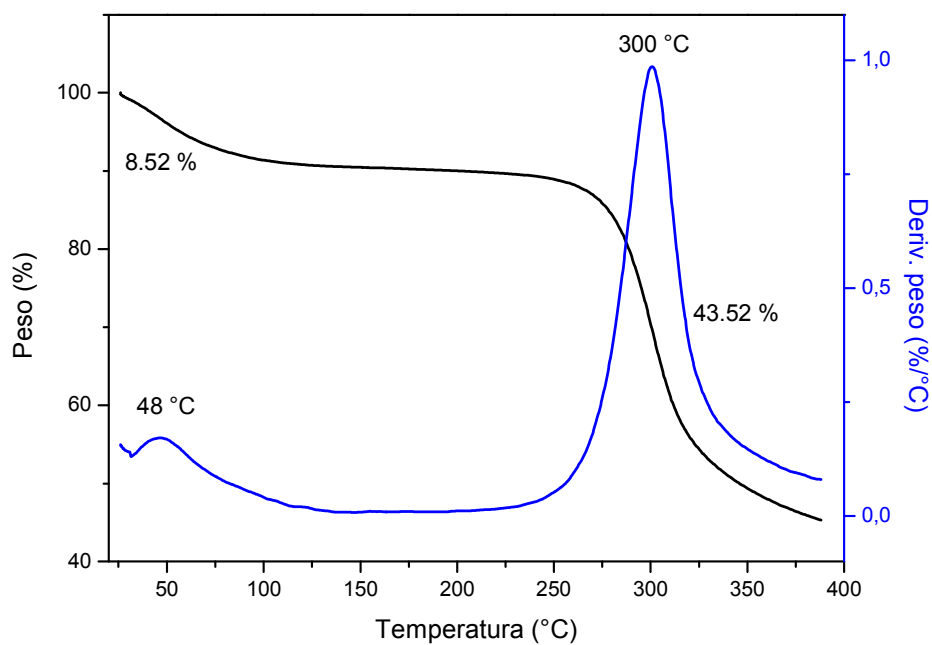


Figura 27. TGA obtenido para una muestra de quitosano comercial.

El análisis termogravimétrico de una muestra de quitosano comercial se presenta en la Figura 27, en este se observa una pérdida de agua superficial alrededor de 48 °C con una disminución en el peso del 8.5%. Posteriormente se observa la degradación de la muestra a 300 °C con una pérdida de peso del 43%. Comparando con el TGA del quitosano extraído que fue estable hasta 266 °C, se observa una mayor estabilidad térmica para la muestra comercial. Este comportamiento puede estar relacionado con la diferencia en los pesos moleculares, ya que el quitosano obtenido del hongo *Aspergillus niger* presenta un Mv de 1.9×10^5 g/mol frente a un 3.1×10^5 g/mol que se reporta para la muestra comercial.

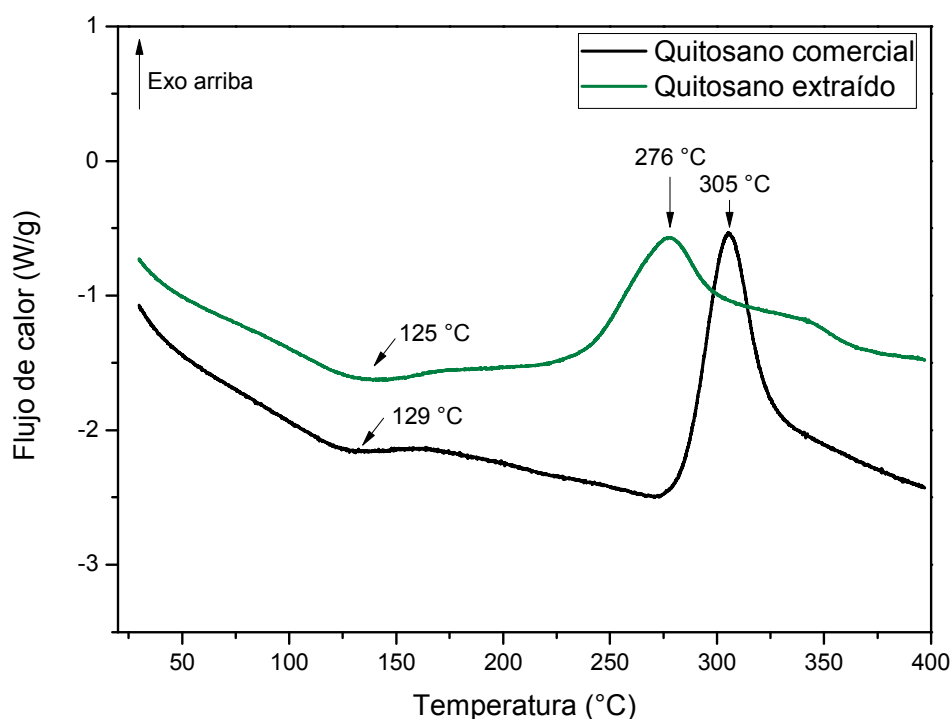


Figura 28. DSC obtenido para una muestra de quitosano extraído.

El análisis DSC se llevó a cabo mediante calentamiento continuo hasta alcanzar los 400 °C, teniendo establecido de acuerdo al TGA que la muestra de quitosano empieza su descomposición térmica alrededor de los 266 °C. También se sabe de

antemano que la muestra contiene un 8.5% de agua, por esta razón se realizaron dos ciclos de calentamiento y enfriamiento, el primero de ellos hasta 110 °C para eliminar las interferencias provocadas por la humedad. En la Figura 28 se muestra el segundo barrido de DSC tanto para la muestra extraída como para la comercial, donde se observa una variación en la pendiente a 125 °C y 129 °C respectivamente, las cuales corresponden a la temperatura de transición vítrea (T_g). Existen en la literatura diferentes reportes acerca de la T_g del quitosano, encontrándose valores que van desde los 95 °C, pasando por los 140-150 °C e incluso llegando a valores alrededor de 203 °C (Bhat *et al.*, 2012; Abdel-Fattah *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2004; Sakurai *et al.*, 2000). Estas diferencias están asociadas con la dificultad que se presenta a la hora de establecer la T_g , debido al carácter higroscópico y al bajo volumen específico de las cadenas rígidas de la muestra. Se podría pensar incluso que el evento térmico a los 125 °C corresponde a una fusión, sin embargo como se mostrará más adelante en la difracción de los rayos X, las muestras son completamente amorfas como para presentar temperaturas de fusión. También se observa un pico exotérmico para cada una de las muestras a 276 °C y 305 °C. Este pico de descomposición ha sido relacionado con las unidades de glucosamina que conforman el biopolímero, ya que las muestras con un bajo grado de desacetilación presentan un segundo pico exotérmico alrededor de los 400 °C correspondiente a la descomposición de las unidades de N-acetilglucosamina siendo esta la parte cristalina del material (Guinesi *et al.*, 2006).

7.3.6 Difracción de rayos X

Al comparar el difractograma del quitosano extraído con el del quitosano comercial en la Figura 29, se observan picos característicos alrededor de 10.5°, 20.0° y 26.5°. El difractograma del quitosano obtenido presenta picos anchos y de baja intensidad lo cual representa una estructura amorfa (Cai *et al.*, 2006). De acuerdo con la literatura la señal a 10.5° corresponde a un espaciamiento d de 8.92 Å, mientras que la señal de 20.0° representa un espaciamiento d de aproximadamente 4.41 Å. Adicionalmente, la señal de 10.5° es característica en

muestras de quitosano obtenidas a partir de α -quitina la cual está presente en la pared celular de los hongos, mientras que en muestras obtenidas a partir de β -quitina esta señal tiende a desaparecer (Abdou *et al.*, 2008).

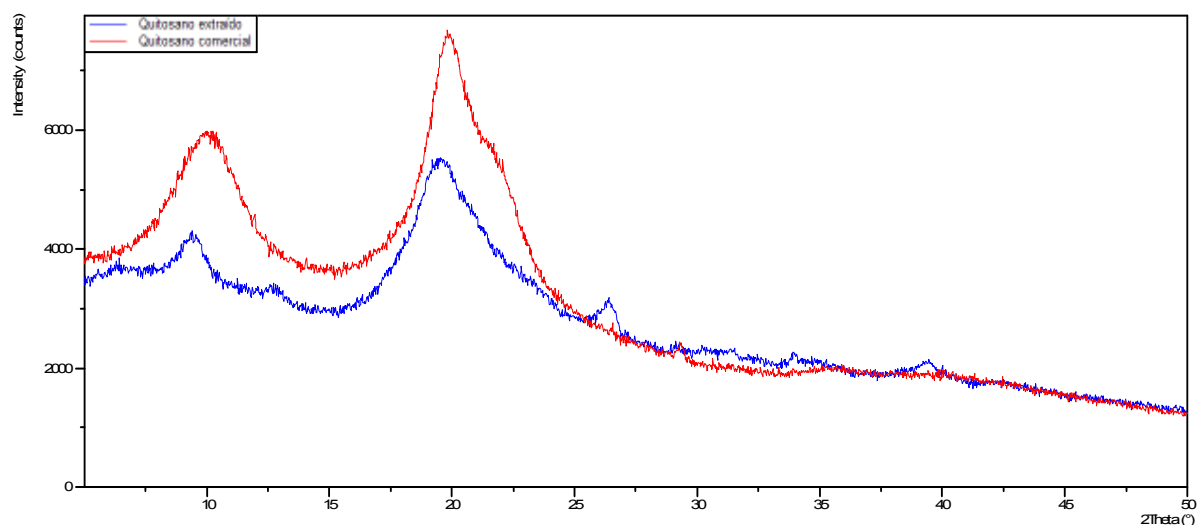


Figura 29. Difractogramas del quitosano extraído (—) y de una muestra comercial (—).

7.4 Extracción de quitosano en planta piloto



Figura 30. Planta piloto para la extracción de quitosano.

Como etapa final para el proceso de obtención de quitosano se realizaron ensayos de extracción en el reactor de la Figura 30 utilizando las condiciones encontradas en el laboratorio. Los resultados fueron reproducibles, sin embargo, se observó una leve disminución del rendimiento al pasar de un 7% en laboratorio a un 5.6% en planta piloto. Es decir que en un ensayo partiendo de 1000 g de micelio seco, se pueden obtener hasta 56 g de quitosano. Tomando como referencia estas cifras, se puede hacer un análisis de costos gruesos sobre el proceso en estudio, teniendo en cuenta los costos de las materias primas vigentes en el mercado. En la Tabla 11 se muestran los costos en dólares (USD) por kilogramo de reactivo, y se calcula el costo para la producción de un 1 kg de quitosano.

Tabla 11. Análisis de costos gruesos para la obtención de 1 kg de quitosano.

Materia prima	Costo \$USD/kg	Cantidad (kg)	Total (\$USD)
Micelio Seco	0.42	17.9	7.5
NaOH	1.84	17.9	32.9
HCl	36.07	0.13	4.7
TOTAL			45.1

Es importante resaltar que el valor reportado en la anterior tabla no incluye los costos energéticos, maquinaria, ni la mano de obra para el proceso. En Tabla 12 se muestran algunos precios de quitosano industrial vendido a granel en diferentes países. Se observa cómo el quitosano extraído en este trabajo podría llegar a competir con países como Chile y Tailandia; sin embargo, los costos de las materias primas están por encima del precio comercial en países como EEUU y China. Hay que tener en cuenta que el quitosano industrial es obtenido a partir de especies marinas, las cuales pueden contener alérgenos, mientras que el quitosano extraído del hongo *Aspergillus niger* no contiene este tipo de sustancias y solo puede estar acompañado de trazas de glucanos los cuales no tienen ningún efecto nocivo, esta característica le da un valor agregado al producto extraído.

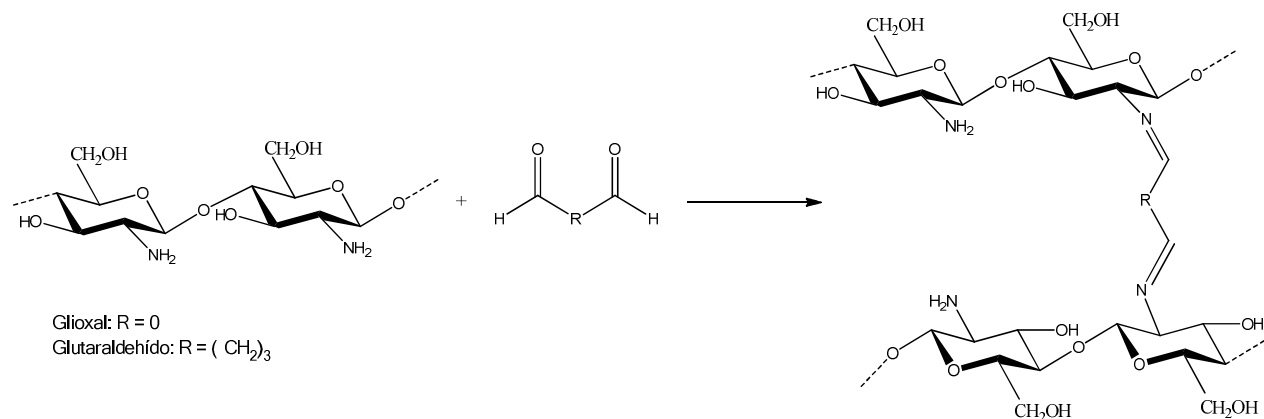
Tabla 12. Precio del quitosano industrial en diferentes países.

País	Empresa	Precio (\$USD/kg)
Tailandia	Marine greenland Co., Ltd.	125.0
Chile	Quitoquimica	100.0
EEUU	Amazon Discovery	41.8
China	Weifang Kehai Chitosan Ltd., Co.	13.5

7.5 Síntesis de hidrogeles de quitosano

7.5.1 Entrecruzamiento con dialdehídos

Una vez caracterizado el quitosano, se usó para la formación de hidrogeles por el entrecruzamiento químico de sus cadenas a través de los grupos amino en C-2. Para el caso de los dialdehídos, la red se obtiene al formar enlaces tipo imina conocidos también como bases de Schiff y se representan en el Esquema 13.



Esquema 13. Reacción de entrecruzamiento de las cadenas de quitosano con dialdehídos.

Se usó entonces el glioxal y el glutaraldehído como agentes de entrecruzamiento, en ambos casos la formación de los geles se evidenció durante el experimento por la aparición de un color amarillo característico del enlace imina, como se muestra en la Figura 31.

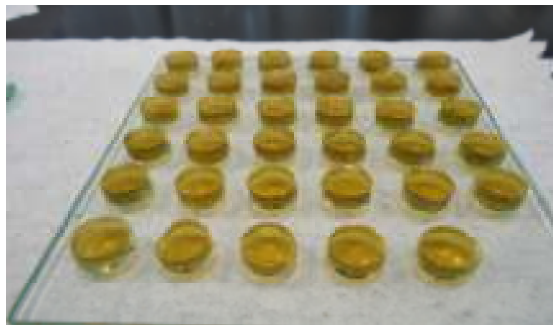
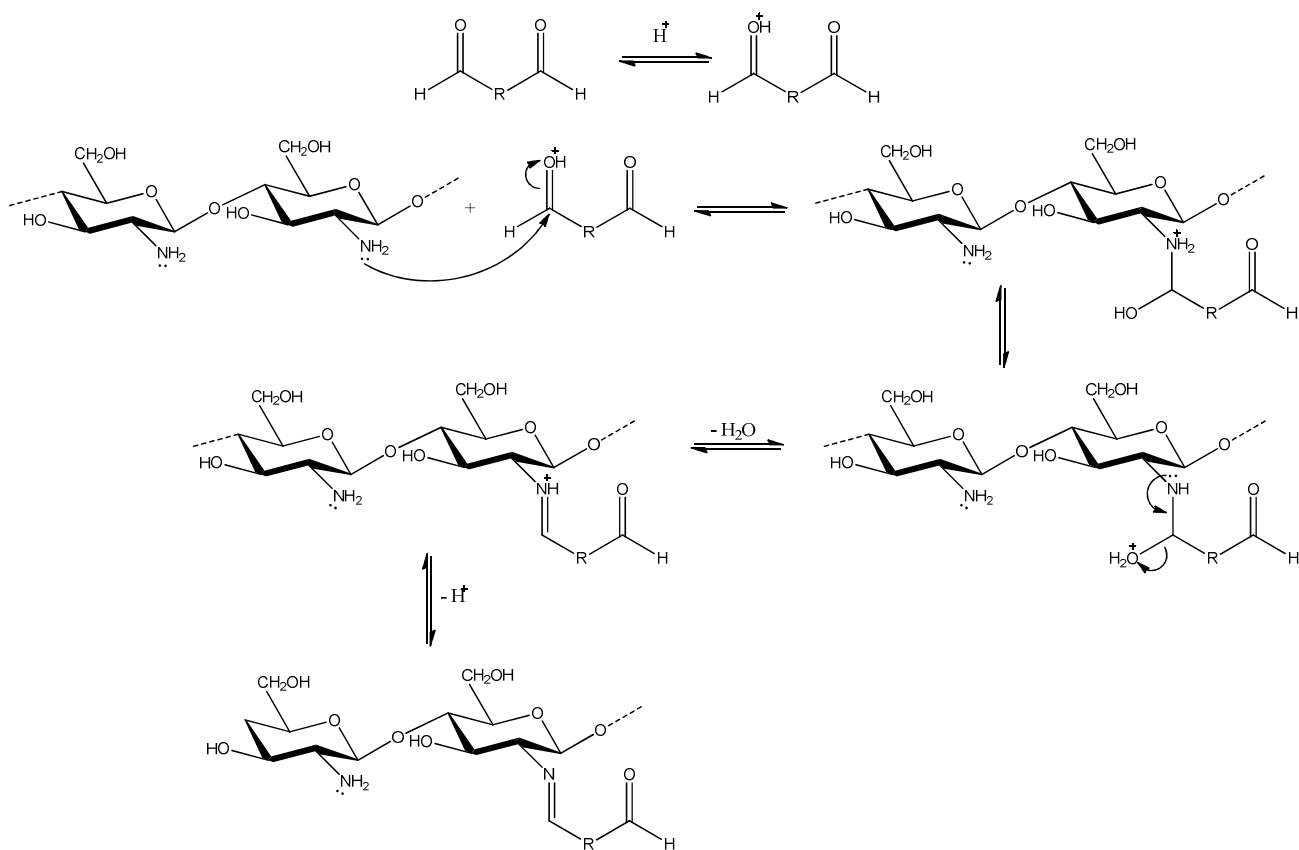


Figura 31. Hidrogeles de quitosano entrecruzados con dialdehídos luego de ser cortados.

De manera general, la obtención de los hidrogeles con este grupo funcional resulta ser bastante versátil debido a la facilidad con que se lleva a cabo la reacción, la cual inicia con un ataque nucleofílico por parte de los grupos amino del quitosano sobre el grupo carbonilo, para generar un intermediario tetraédrico que fácilmente forma el doble enlace $C=N$ mediante la eliminación de una molécula de agua. En el Esquema 14 se muestra el mecanismo propuesto para la reacción de entrecruzamiento, en éste se muestra la reacción con uno de los extremos del dialdehído correspondiente y se espera que suceda este mismo proceso con el otro extremo.



Esquema 14. Mecanismo de reacción para el entrecruzamiento de las cadenas de quitosano con dialdehídos.

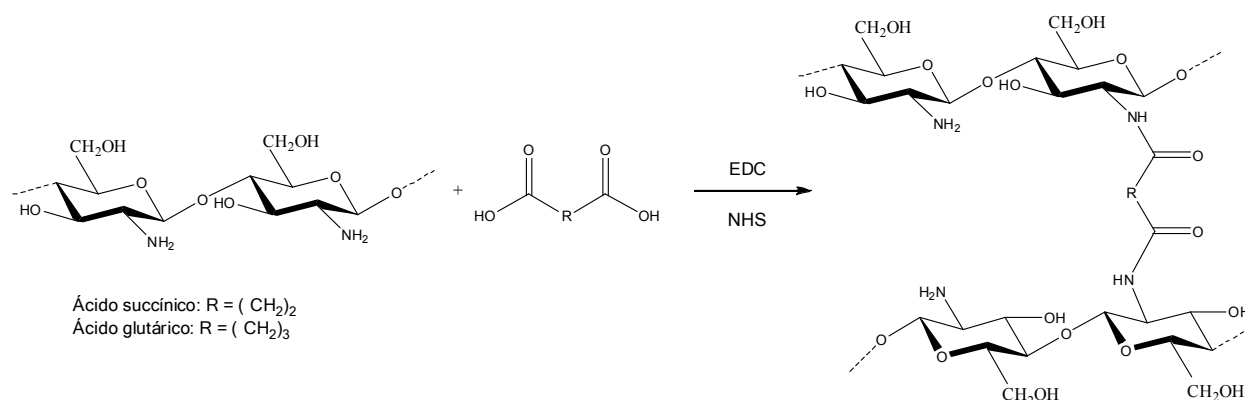
Con el glutaraldehído como agente entrecruzante fue posible obtener hidrogeles con diferentes porcentajes de entrecruzamiento, con resistencia al tacto y a los procesos de hinchamiento. Con el glioxal por el contrario sólo se obtuvo hidrogeles resistentes cuando el porcentaje de entrecruzamiento fue alto, y aun así eran materiales débiles que fácilmente se fracturaban. En la Tabla 13 se resumen las observaciones hechas con cada uno de los hidrogeles obtenidos; en esta tabla es clara la influencia que tiene la longitud del agente entrecruzante en las propiedades finales del material polimérico. Al tener una menor longitud, es menos probable que la formación de las bases de Schiff se de en ambos extremos del dialdehído, por lo que el entrecruzamiento real puede ser mucho menor al valor calculado teóricamente. El glutaraldehído que es una molécula que genera un entrecruzamiento a través de cinco átomos de carbono, logra unir las cadenas de quitosano con una mayor efectividad.

Tabla 13. Características que presentaron los hidrogeles obtenidos con dialdehídos a diferentes porcentajes de entrecruzamiento.

Entrecruzamiento (%)	Características del hidrogel	
	Glioxal	Glutaraldehído
50	Se formó el gel pero no mantuvo su forma	Todos los hidrogeles presentaron resistencia al tacto y al hinchamiento
75	El gel mantuvo su forma pero se fragmentó fácilmente al hincharse	
100	El hidrogel presentó resistencia al tacto y al hinchamiento	

7.5.2 Entrecruzamiento con ácidos dicarboxílicos

Se empleó ácido succínico y ácido glutárico para el entrecruzamiento del quitosano extraído. En este caso la formación de los geles se da mediante la generación de enlaces tipo amida entre los ácidos dicarboxílicos y el grupo amino del quitosano, como se representa en el Esquema 15. En este caso los hidrogeles fueron incoloros a diferencia de los obtenidos con los dialdehídos (Figura 32).



Esquema 15. Reacción de entrecruzamiento de las cadenas de quitosano con ácidos dicarboxílicos.

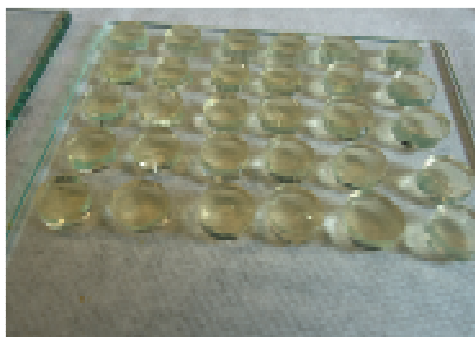
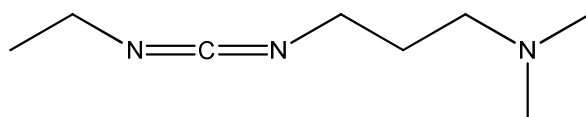


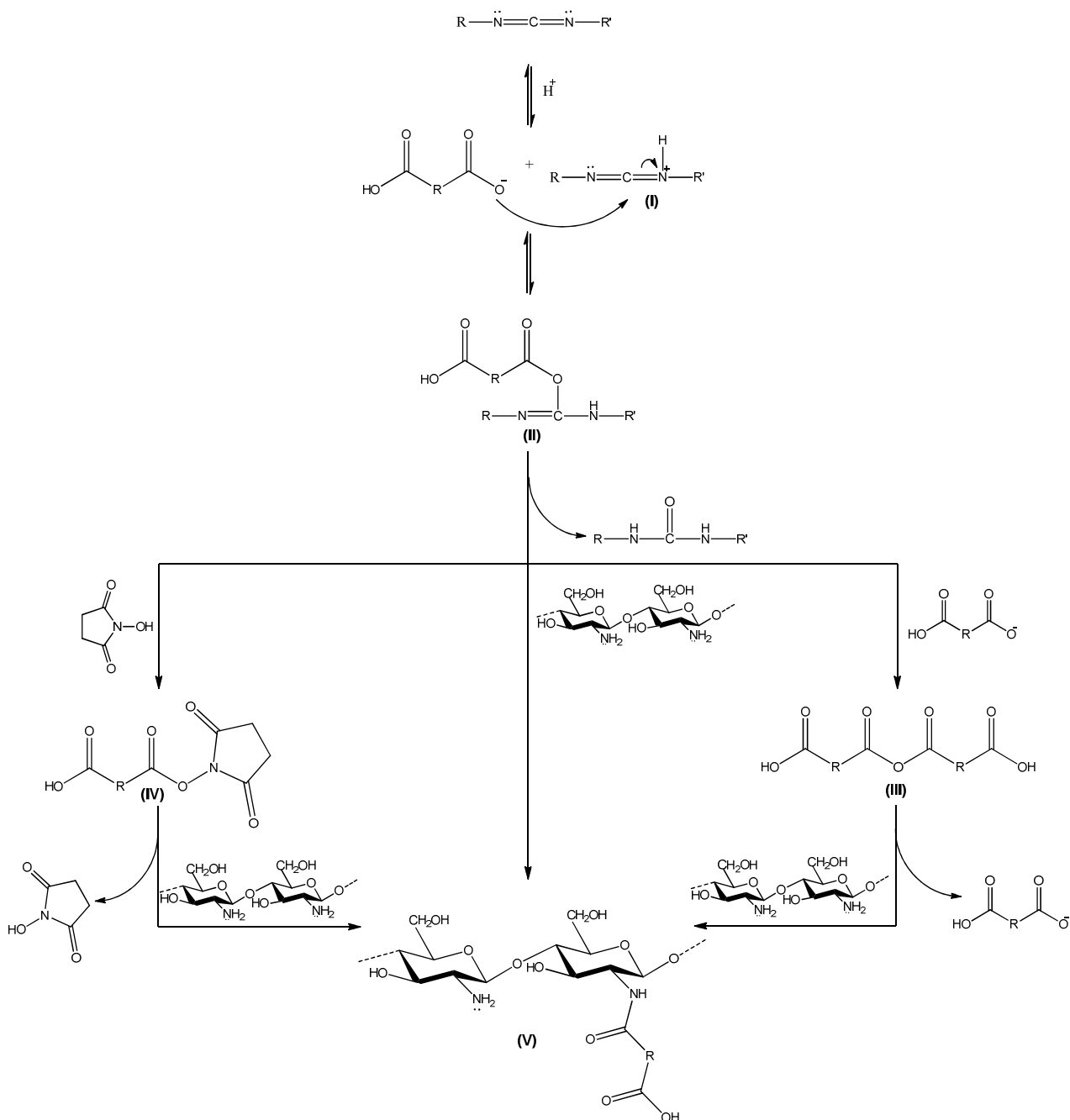
Figura 32. Hidrogeles de quitosano entrecruzados con ácido glutárico luego de ser cortados con el sacabocados.

La formación de los enlaces tipo amida resulta bastante compleja debido a la presencia de un mal grupo saliente (-OH) en el grupo carbonilo, por lo cual se hace necesario el uso de la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) cuya estructura se muestra en el Esquema 16. Esta carbodiimida se caracteriza por ser soluble en agua, funciona en un rango de pH de 4 a 6 y es comúnmente usada en reacciones que involucran aminas primarias.



Esquema 16. Estructura química de la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

De acuerdo con el Esquema 17, la EDC inicialmente abstrae un protón del medio generando la especie (I), sobre la cual se realiza un ataque nucleofílico por parte de los iones carboxilato produciendo la O-acilisourea (II) (Nakajima *et al.*, 1995). Este intermediario es muy reactivo y puede sufrir el ataque nucleofílico del grupo amino del quitosano lo cual generaría el nuevo enlace tipo amida que se busca en la reacción (V). La reactividad de (II) es tan alta que puede reaccionar con otras especies del medio como por ejemplo, con otra molécula de ácido carboxílico y generar anhídridos (III), los cuales pueden ser hidrolizados por el medio acuoso o reaccionar con el quitosano para formar la especie (V).



Esquema 17. Mecanismo de reacción propuesto para el entrecruzamiento de las cadenas de quitosano con los ácidos dicarboxílicos.

La especie (II) también puede ser hidrolizada por el medio acuoso, lo que desfavorece por completo la reacción de entrecruzamiento del quitosano. La adición de la N-hidroxisuccinimida (NHS) a la mezcla de reacción, permite atrapar la O-acilisourea mediante la generación del correspondiente éster activado (IV),

que por lo general suele ser estable y menos reactivo. De esta forma se mejora el rendimiento de la reacción de condensación, ya que una vez generada la especie (IV), solamente el grupo amino del quitosano tiene el poder nucleofílico para generar la especie (V); de la misma forma reacciona el otro extremo del ácido carboxílico para generar el entrecruzamiento de las cadenas.

A pesar de las consideraciones tomadas en cuenta para favorecer la reacción entre los ácidos dicarboxílicos y el quitosano, sólo se obtuvieron hidrogeles resistentes cuando el porcentaje de entrecruzamiento fue alto. Esto demuestra el bajo rendimiento con el cual ocurre esta reacción. En la Tabla 14 se resumen las observaciones hechas con cada uno de los hidrogeles obtenidos.

Tabla 14. Características que presentaron los hidrogeles obtenidos con ácidos dicarboxílicos a diferentes porcentajes de entrecruzamiento.

Entrecruzamiento (%)	Características del hidrogel	
	Ácido succínico	Ácido glutárico
50	Se obtuvo una solución viscosa	Se obtuvo una solución viscosa
75	Se formó el gel pero no mantuvo su forma	El gel mantuvo su forma pero se fragmentó fácilmente al hincharse
100	El gel mantuvo su forma pero se fragmentó fácilmente al hincharse	El hidrogel presentó resistencia al tacto y al hinchamiento

7.6 Caracterización de los hidrogeles de quitosano

Mediante espectroscopía IR se pudo confirmar la formación de los hidrogeles gracias a la banda característica de estiramiento del enlace C=N a 1670 cm^{-1} y la deformación del enlace C-N a 1072 cm^{-1} que se pueden observar en el espectro de la Figura 33; en esta misma figura se aprecia una disminución de la vibración de estiramiento del enlace C=O a 1635 cm^{-1} con respecto al quitosano de partida.

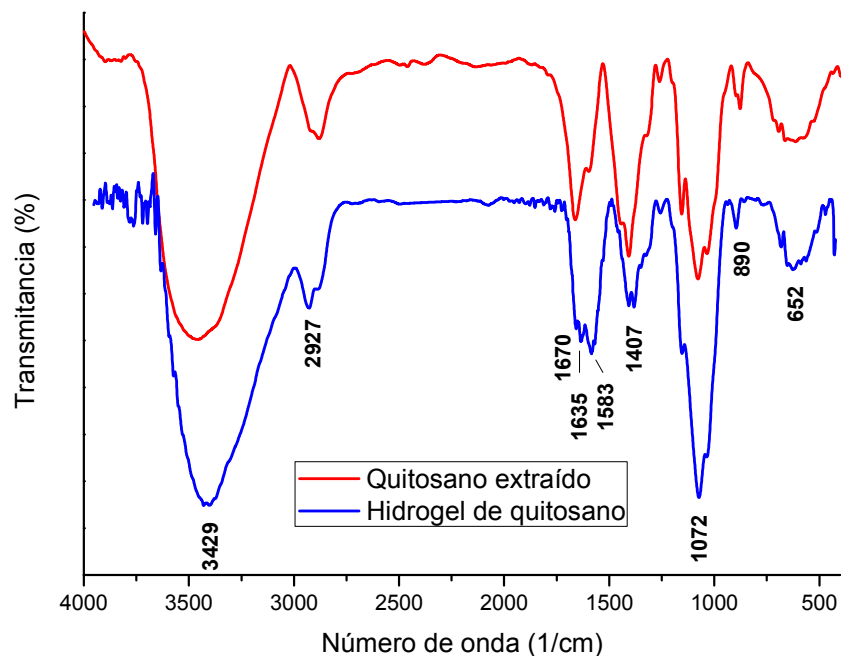


Figura 33. Espectro IR de una de las muestras de hidrogel obtenida con quitosano extraído.

Mediante microscopía electrónica de barrido se puede ver la transformación de la superficie del material partiendo desde el micelio del hongo hasta la obtención de los hidrogeles. En la Figura 34 la micrografía (A) corresponde a una muestra de micelio sin ningún tipo de tratamiento, en esta se observan aglomerados con cierta regularidad pertenecientes a la superficie de las hifas. En la micrografía (B) se observa cómo mediante el tratamiento fuertemente alcalino se logra destruir la pared celular permitiendo la obtención del quitosano. Posteriormente, en las micrografías (C) y (D) se observan dos muestras de quitosano luego de la reacción de entrecruzamiento. Cuando se realiza el enlazamiento químico de las cadenas de quitosano se obtiene un material altamente poroso a través del cual pueden difundir moléculas de menor tamaño. Se observa además cómo los hidrogeles presentan un tamaño de poro menor cuando el porcentaje de entrecruzamiento aumenta.

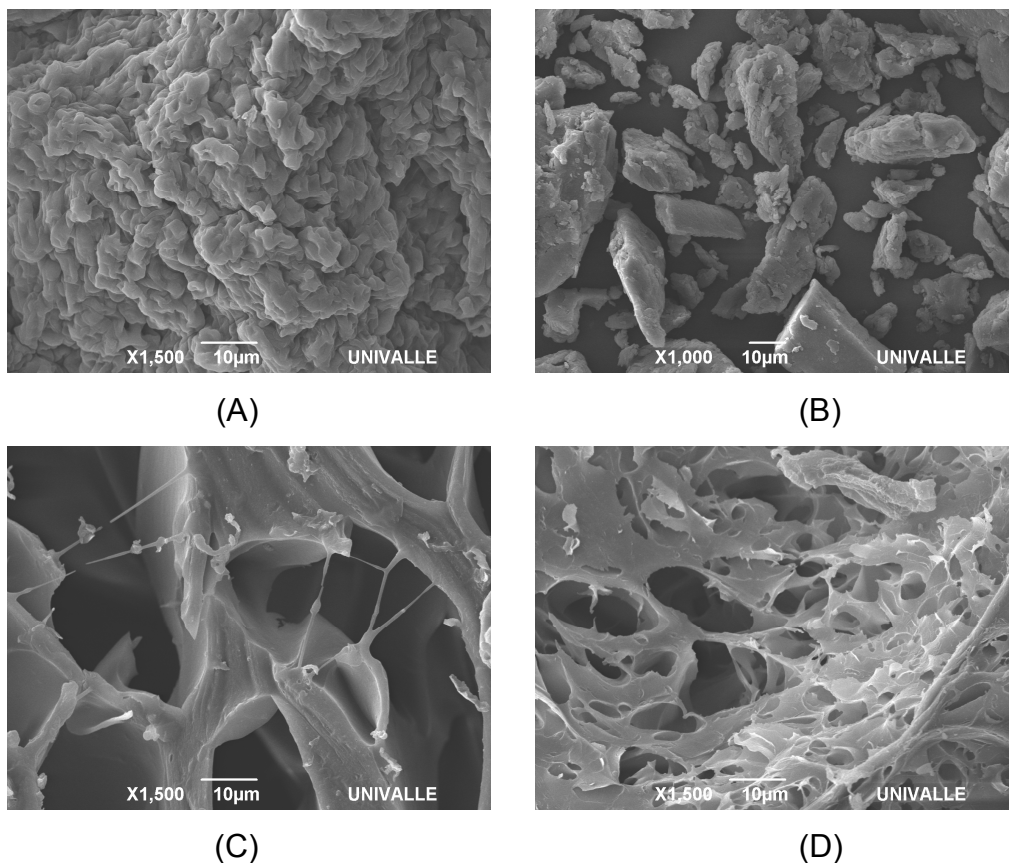


Figura 34. Microscopía electrónica de barrido para: (A) micelio, (B) quitosano extraído, (C) hidrogel con un 50% de entrecruzamiento y (D) hidrogel con un 100% de entrecruzamiento.

Mediante análisis termogravimétrico se comparó la estabilidad de todos los hidrogeles sintetizados. En las Figuras 35 y 36 se muestran los TGA de las muestras entrecruzadas con glutaraldehído y ácido glutárico al 100%. Para las demás muestras se obtuvieron gráficas similares y en la Tabla 15 se reportan los valores donde se observó la mayor pérdida de peso debido a los procesos de degradación térmica.

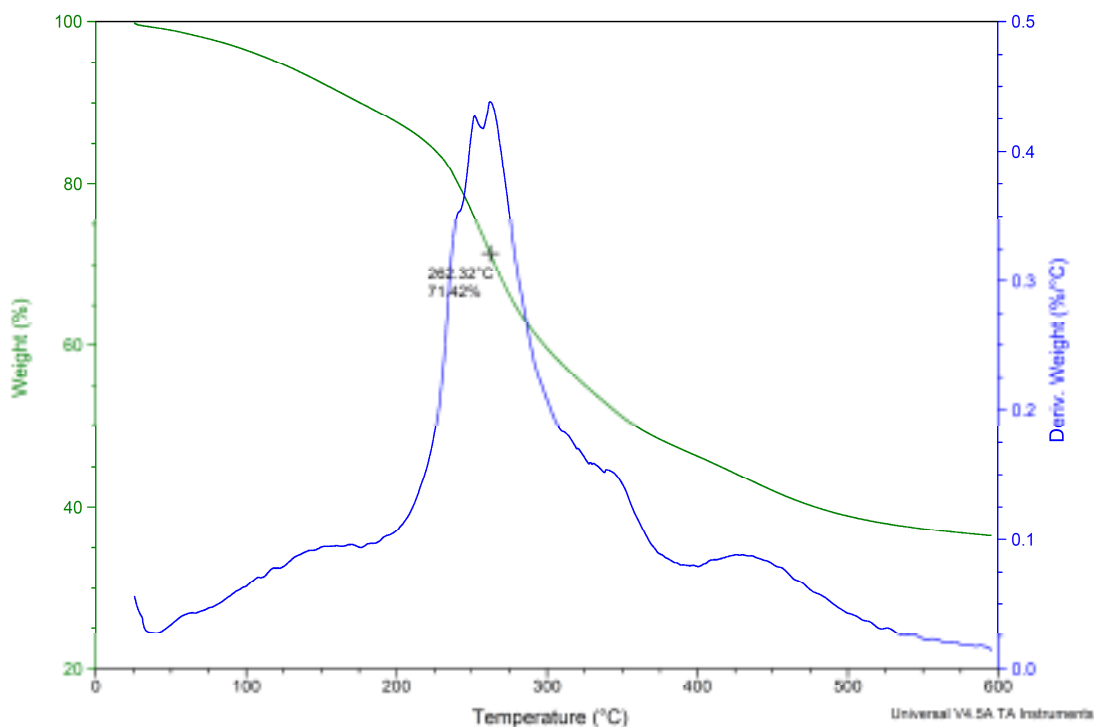


Figura 35. Análisis termogravimétrico (TGA) para el hidrogel obtenido con glutaraldehído al 100%.

Todas las muestras analizadas mediante TGA presentaron estabilidad térmica por encima de los 200 °C. Se pudo observar una leve influencia con respecto al porcentaje de entrecruzamiento, ya que las muestras con mayor grado de entrecruzamiento se degradaron a temperaturas superiores. Los hidrogeles obtenidos con ácidos carboxílicos describen una temperatura de degradación más alta frente a los obtenidos con aldehídos; los enlaces tipo amida permite generar entrecruzamiento físico mediante enlaces de hidrógeno, lo cual puede mejorar las propiedades del material. Además, la estabilidad del enlace amida es superior porque cuenta con estructuras de resonancia que la hacen más estable, a diferencia de las iminas que poseen un plano nodal en el enlace conformado por átomos de carbono y nitrógeno en hibridación sp^2 , lo cual los hace más lábiles y susceptibles a la degradación; por esta razón en muchos casos una vez se forma el enlace imina se reduce hasta la amina secundaria correspondiente en presencia de $NaBH_3CN$.

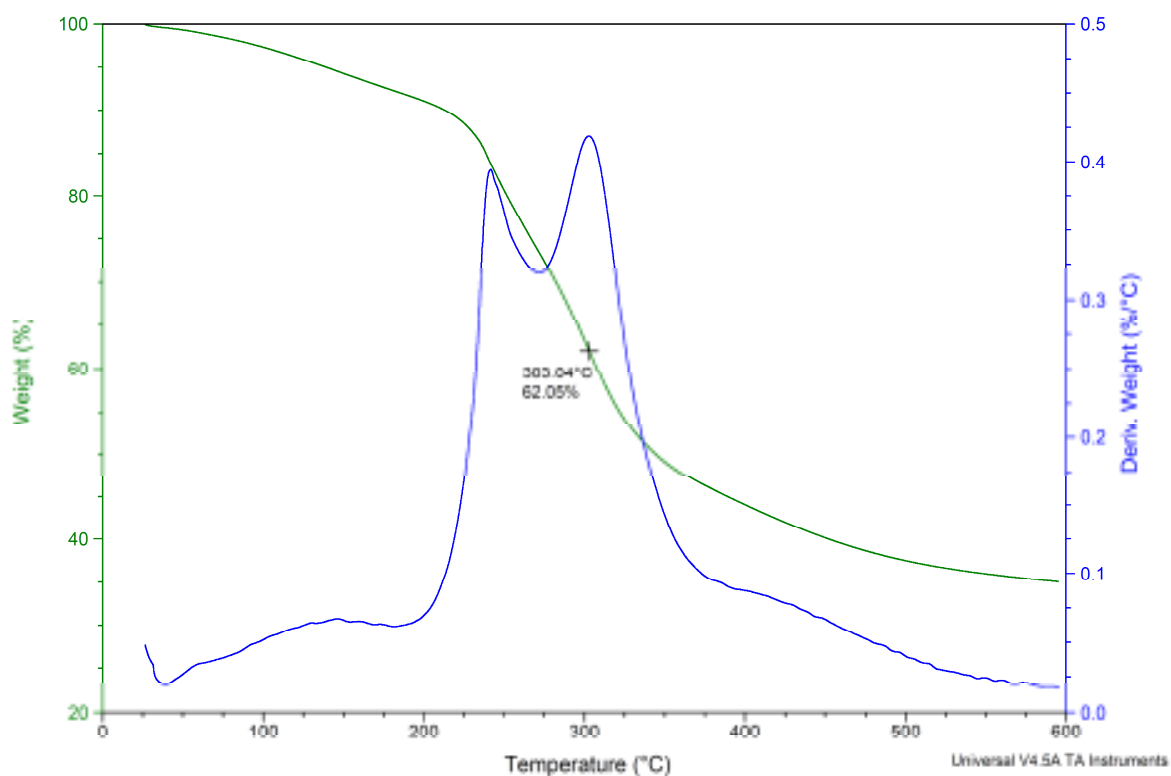


Figura 36. Análisis termogravimétrico (TGA) para el hidrogel obtenido con ácido glutárico al 100%.

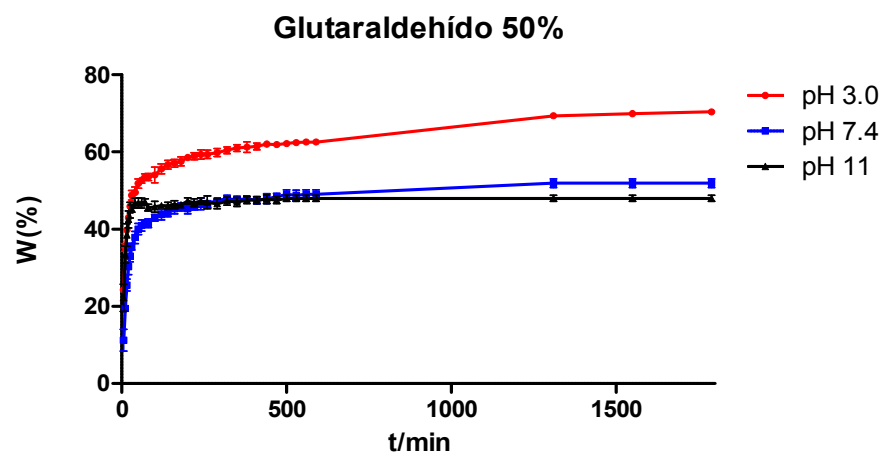
Tabla 15. Temperaturas de degradación para los diferentes hidrogeles sintetizados.

Agente entrecruzante	Entrecruzamiento (%)	Peso perdido (%)	Temperatura (°C)
Gloxal	75	68.12	250.21
	100	74.22	251.03
Glutaraldehído	50	77.63	250.78
	75	73.62	256.25
	100	71.42	262.32
Ácido succínico	100	70.89	295.75
Ácido glutárico	100	62.05	303.04

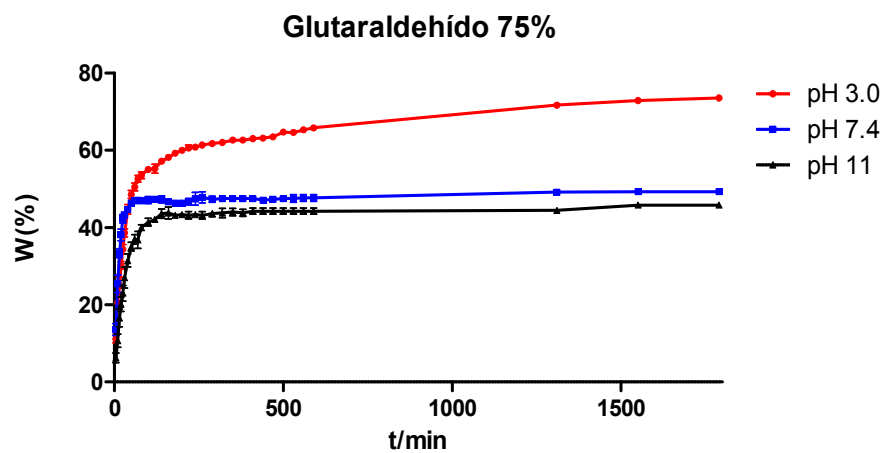
7.7 Estudios de hinchamiento de los hidrogeles de quitosano

Para estudiar el hinchamiento de los hidrogeles, se tomaron en cuenta variables como el pH del medio y densidad de entrecruzamiento. Una vez se introducían las pastillas en estado xerogel en el medio de hinchamiento se empezaba a dar una transición de fase, en donde inicialmente el hidrogel aumentaba su volumen y trataba de perder su forma, pero luego de varias horas (entre 1 y 2 horas) recuperaba su forma inicial y continuaba aumentando de tamaño, alcanzando un alto grado de elasticidad. Estos estudios se realizaron por triplicado a valores de pH de 3.0, 7.4 y 11.0, manteniendo una temperatura constante de 37°C.

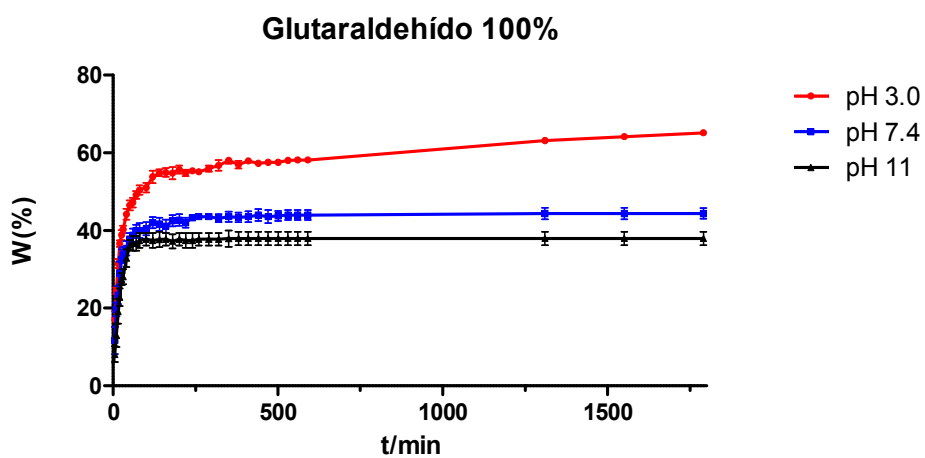
En la Figura 37 se muestra el grado de hinchamiento W calculado a partir de la Ecuación 2 en función del tiempo para los diferentes hidrogeles sintetizados con glutaraldehído a diferentes valores de pH. En estas gráficas se observa cómo los hidrogeles con diferente porcentaje de entrecruzamiento describen un proceso de hinchamiento similar; no obstante, se observa un mayor grado de hinchamiento cuando las muestras se encuentran a pH ácido (pH 3.0).



(A)



(B)



(C)

Figura 37. Grado de hinchamiento (W) en función del tiempo de los hidrogeles obtenidos con glutaraldehído: (A) 50%, (B) 75%, (C) 100%.

En la Tabla 16 se muestran los valores de W una vez los hidrogeles alcanzaron su equilibrio termodinámico de hinchamiento.

Tabla 16. Valores de W en el equilibrio de hinchamiento a los diferentes valores de pH y porcentajes de entrecruzamiento.

Entrecruzamiento (%)	Weq (%)		
	pH 3.0	pH 7.4	pH 11.0
50	79.69	51.87	47.99
75	76.04	49.31	45.85
100	67.49	44.60	37.96

Los valores de la anterior tabla se pueden analizar mediante la gráfica de barras de la Figura 38, en ésta se puede observar claramente cómo el grado de hinchamiento de los hidrogeles de quitosano depende tanto del porcentaje de entrecruzamiento como del pH del medio. Se observa que al aumentar la densidad de entrecruzamiento de las cadenas del polímero, disminuye el grado de hinchamiento, ya que al estar las cadenas poliméricas más unidas, el hidrogel presenta un tamaño de poro más pequeño que dificulta la entrada de la solución.

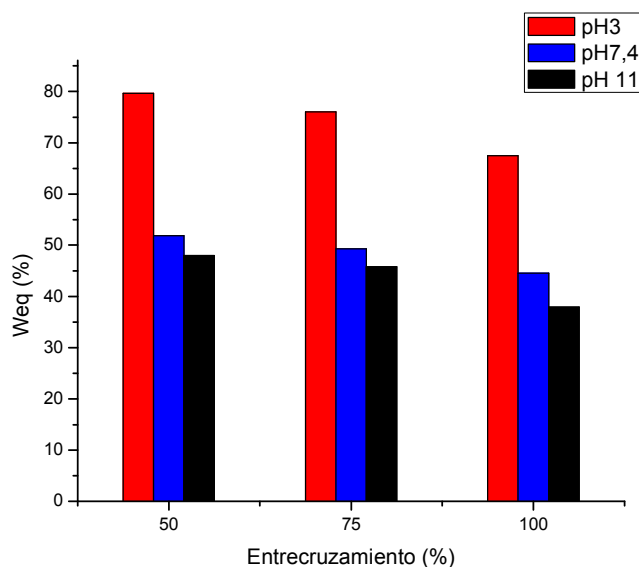
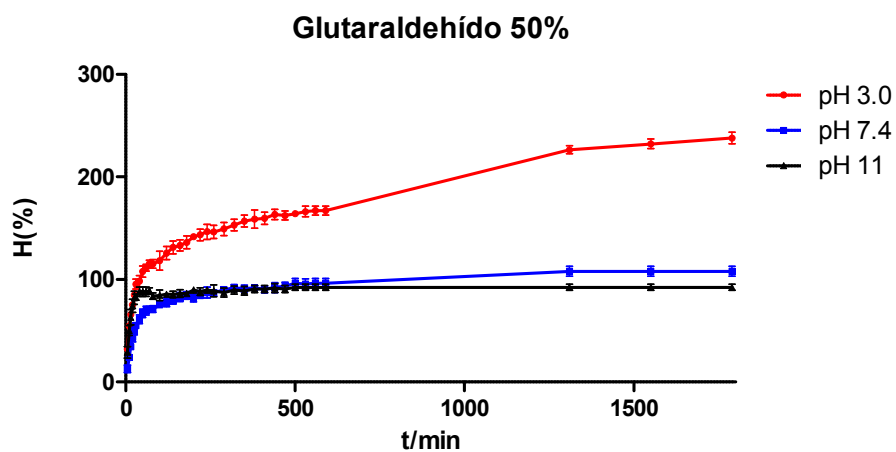
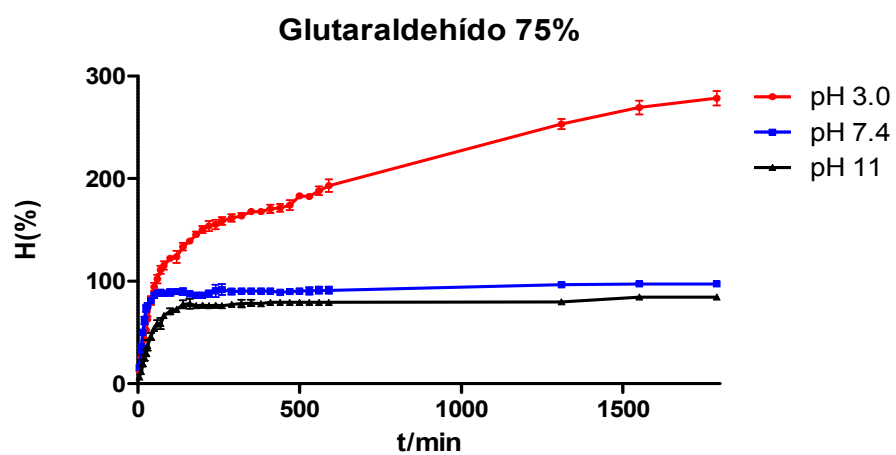


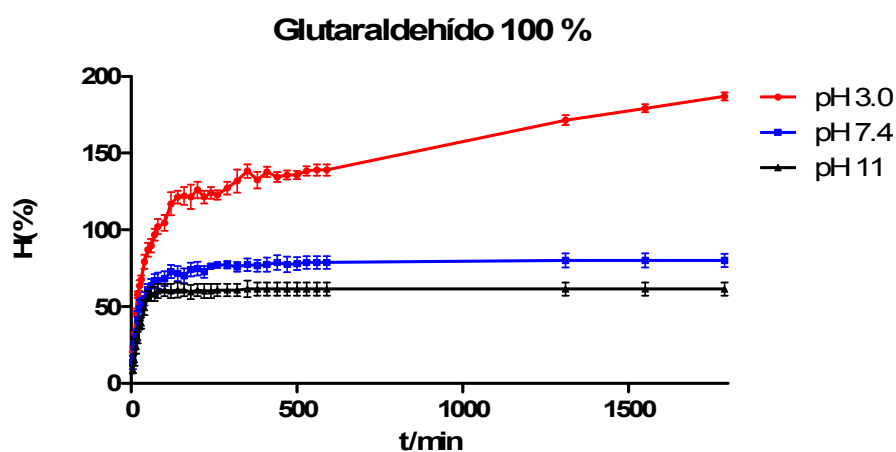
Figura 38. Grados de hinchamiento (W) en el equilibrio para los hidrogeles de quitosano con glutaraldehído a diferentes valores de pH y porcentajes de entrecruzamiento.



(A)



(B)



(C)

Figura 39. Contenido de agua (H) en función del tiempo para los hidrogeles de quitosano obtenidos con glutaraldehído: (A) 50%, (B) 75%, (C) 100%.

En la Figura 39 se representa el contenido de agua H calculado mediante la Ecuación 3 en función del tiempo, para los hidrogeles obtenidos con glutaraldehído. En esta gráfica se observa de nuevo que hay una mayor absorción de la solución circundante a pH ácido. Esta respuesta de hinchamiento selectiva frente al pH se debe a la presencia de los grupos ionizables en las cadenas del polisacárido entrecruzado. A valores de pH ácidos se lleva a cabo una reacción ácido-base, en la cual los grupos $-NH_2$ libres del quitosano se protonan generando la especie $-NH_3^+$ que conlleva a la separación de las cadenas poliméricas tanto por repulsiones electrostáticas entre cargas positivas, como también por el rompimiento de los enlaces de hidrógeno intramoleculares, permitiendo así un mayor hinchamiento del material.

A valores de pH neutro y básico, los grupos aminos están desprotonados disminuyendo las interacciones repulsivas entre las cadenas poliméricas, las cuales se aproximan entre sí mediante enlaces de hidrógeno, manteniendo el material colapsado.

La respuesta selectiva de los hidrogeles frente al pH del medio es una de las propiedades por las cuales estos materiales han sido calificados como inteligentes (Katime, 2000); para el caso específico de los hidrogeles de quitosano, se podrían emplear para hacer liberación de fármacos dirigida hacia sitios específicos del organismo donde se tenga un ambiente con un pH moderadamente ácido, favoreciendo el hinchamiento del material y la difusión del fármaco a través de él. Optimizar los tratamientos con fármacos antitumorales, es uno de los principales retos que afronta la humanidad en las últimas décadas, debido a que éstos presentan una baja selectividad hacia las células cancerígenas y una inaceptable toxicidad sobre los tejidos sanos. Sin embargo, los tejidos cancerosos se caracterizan por tener un pH más ácido (alrededor de 4.5) que los tejidos saludables (Guerrero-Ramirez *et al.*, 2008; Sáez-Martínez *et al.*, 2008). Esta marcada diferencia puede servir como señal de diferenciación entre células buenas y malas; en este caso si los hidrogeles de quitosano son llevados a

escalas nanométricas, serían buenos candidatos para ser usados como dispositivos de liberación de fármacos anticancerígenos, minimizando así los efectos adversos que estos presentan.

7.7.1 Estudio cinético del hinchamiento

Es importante determinar de qué orden es la cinética que describen los hidrogeles en estudio durante el proceso de hinchamiento. Para una cinética de primer orden, la velocidad de hinchamiento (dW/dt) es directamente proporcional a la capacidad de hinchamiento disponible, la cual se calcula haciendo la diferencia entre el hinchamiento en el equilibrio W_{∞} y el hinchamiento W en un tiempo t . Por lo tanto el modelo matemático para una cinética de primer orden se describe mediante la Ecuación 10, donde K es la constante de proporcionalidad.

$$\frac{dW}{dt} = K(W_{\infty} - W) \quad (\text{Ecuación 10})$$

Haciendo la respectiva separación de variables y la posterior integración de la Ecuación 10, se obtiene la siguiente expresión:

$$\ln \left[\frac{W_{\infty}}{W_{\infty} - W} \right] = Kt \quad (\text{Ecuación 11})$$

Una expresión similar a la Ecuación 11, se puede deducir a través de la ley de Fick para el hinchamiento controlado por difusión de películas unidimensionales:

$$\ln\left[\frac{W_{\infty}}{W_{\infty}-W}\right] \cong \frac{\pi^2 Dt}{h^2} \quad (\text{Ecuación 12})$$

En la Ecuación 12, D es el coeficiente de difusión del solvente que promueve el hinchamiento y h es el espesor de la pastilla en estudio. Esta expresión tiene como condición que D y h sean constantes. Por lo tanto si $K = \pi^2 D / h^2$, las Ecuaciones 11 y 12 son equivalentes. Siguiendo la Ecuación 11, al graficar $\ln[W_{\infty} / (W_{\infty} - W)]$ en función del tiempo para cada una de los hidrogeles sintetizados (Figura 40), se observa la no linealidad de cada una de las gráficas, lo cual indica que el valor de K de la Ecuación 11 no es constante; este comportamiento demuestra entonces una variación del coeficiente de difusión D a medida que transcurre el hinchamiento. Se deduce entonces que los datos de hinchamiento obtenidos experimentalmente, no se ajustan a una cinética de primer orden y que el proceso no está controlado únicamente por fenómenos de difusión.

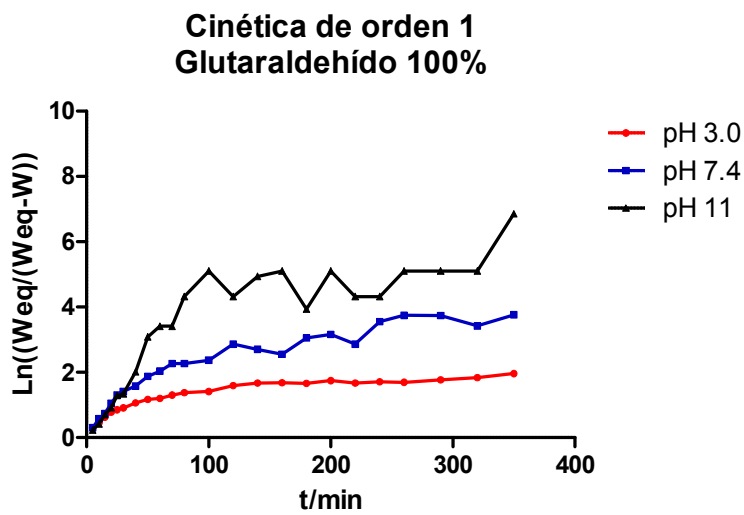
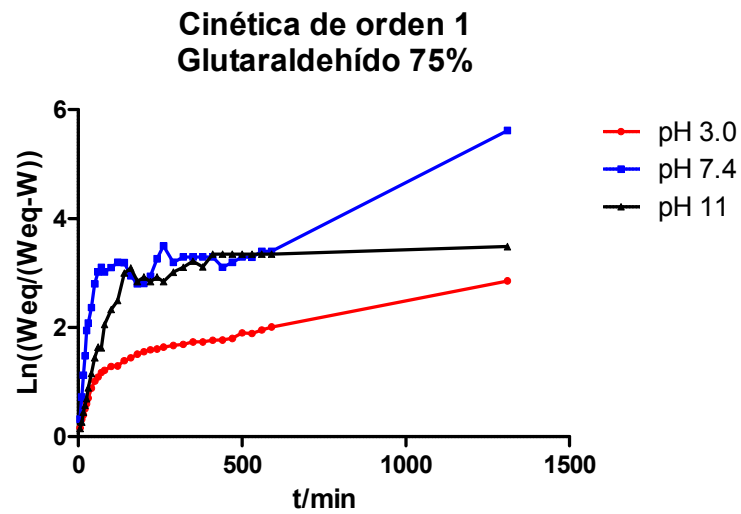
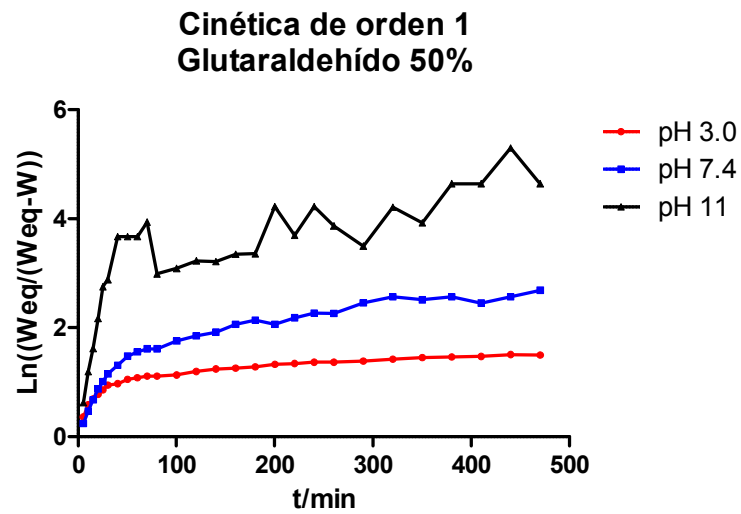


Figura 40. Cinéticas de primer orden para los hidrogeles de quitosano con glutaraldehído.

Para una cinética de segundo orden, la velocidad de hinchamiento (dW/dt) es directamente proporcional al cuadrado de la capacidad de hinchamiento disponible, es decir $(W_{\infty} - W)^2$, como se describe a continuación:

$$\frac{dW}{dt} = K(W_{\infty} - W)^2 \quad (\text{Ecuación 13})$$

Haciendo la respectiva separación de variables e integrando a ambos lados de la igualdad, la Ecuación 13 se convierte en:

$$W = \frac{KW_{\infty}^2 t}{1 + KW_{\infty}^2 t} \quad (\text{Ecuación 14})$$

Dividiendo a ambos lados de la igualdad de la Ecuación 14 entre $KW_{\infty}^2 W$ y reordenando la expresión, se obtiene la Ecuación 15.

$$\frac{t}{W} = \frac{t}{W_{\infty}} + \frac{1}{KW_{\infty}^2} \quad (\text{Ecuación 15})$$

La Ecuación 15 es una ecuación lineal de la forma $y = mx + B$, en donde la pendiente $m = 1/W_{\infty}$ y el intercepto $B = 1/KW_{\infty}^2$, por lo que al graficar t/W en función del tiempo se espera obtener una línea recta. En la Figura 41 se observa claramente un comportamiento lineal al realizar dicha gráfica, demostrándose así que los hidrogeles de quitosano se ajustan a un modelo cinético de segundo orden.

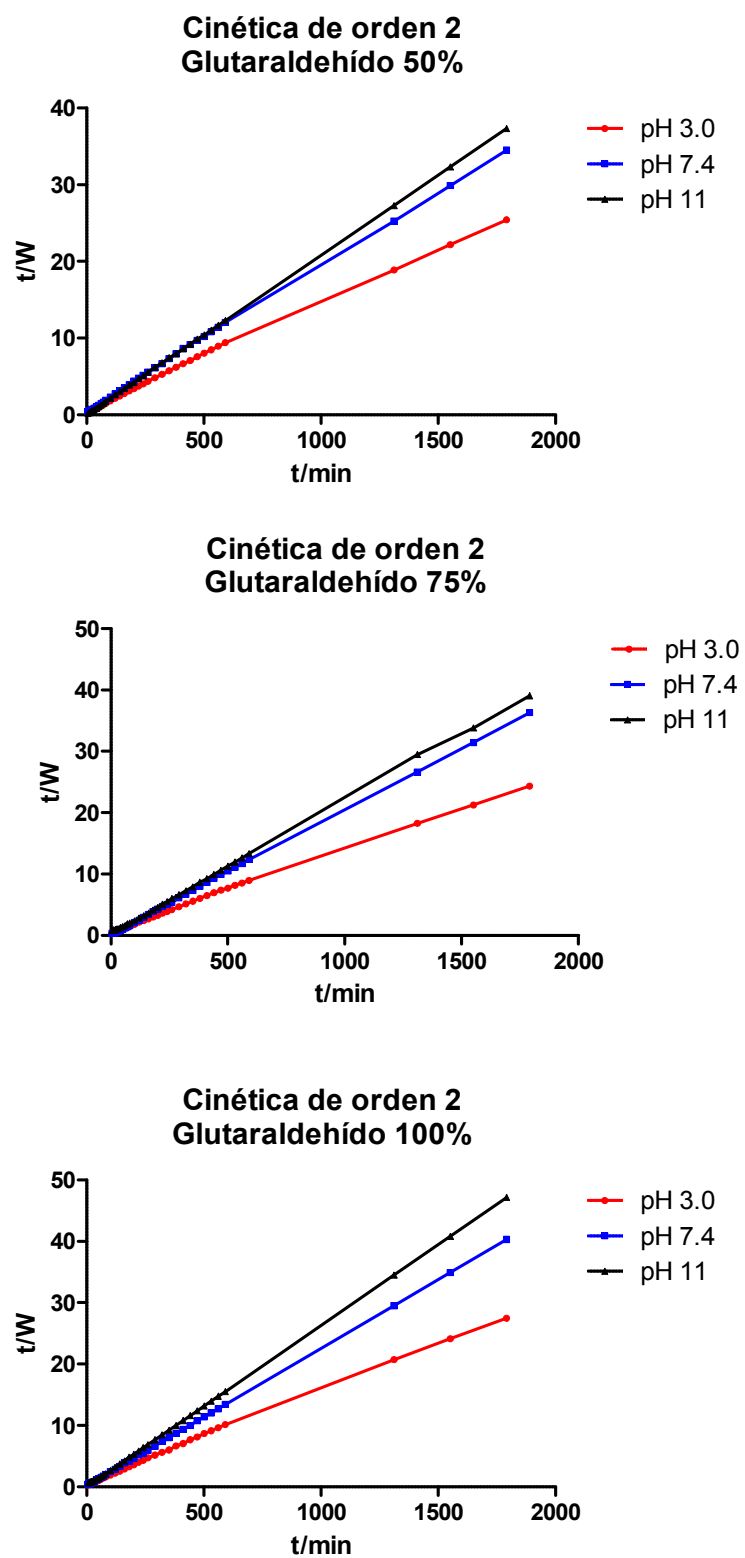


Figura 41. Cinéticas de segundo orden para los hidrogel de quitosano con glutaraldehído.

Para los hidrogeles obtenidos a partir de ácidos carboxílicos, sólo fue posible estudiar el hinchamiento con las muestras que tenían un entrecruzamiento del 100% debido a la baja resistencia que presentaron las otras proporciones. Al igual que con los aldehídos, los valores se ajustaron a una cinética de segundo orden.

7.8 Cinética de liberación *in vitro* de un fármaco modelo

Como una posible aplicación para los hidrogeles obtenidos en este trabajo, se estudió la liberación de Betahistina desde ellos. Este fármaco antivertiginoso es un análogo de la histamina, que se caracteriza por ser una droga que se absorbe rápidamente en el organismo, convirtiéndose en metabolitos inactivos. El principal efecto adverso de la Betahistina es la generación de ulcera péptica. Los estudios de liberación se llevaron a cabo a 37 °C y pH de 7.4 buscando de esta forma simular condiciones fisiológicas. Para el estudio se emplearon hidrogeles obtenidos con glutaraldehído y ácido glutárico. La concentración de la droga en estudio, se determinó construyendo una curva de calibración con soluciones de concentración conocida en un rango de 0.25 a 5 mg/L. En la Figura 42 se muestra la curva de calibración y en la Tabla 17 se encuentran los datos obtenidos de la regresión lineal correspondiente.

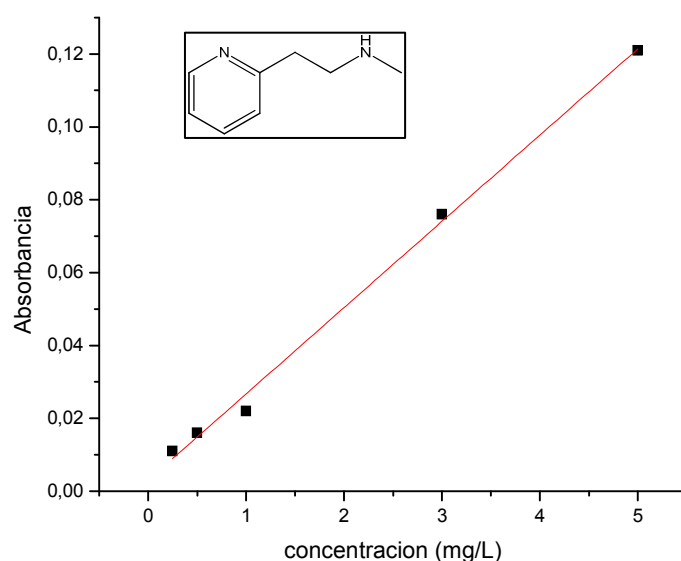


Figura 42. Curva de calibración para la betahistina analizada por espectroscopía ultravioleta.

Tabla 17. Valores obtenidos de la regresión lineal para la curva de calibración

$y = mx + B$		
m (Abs./ppm)	B (Abs.)	R^2
0,024	0,003	0,995

El proceso de liberación de fármacos desde matrices poliméricas está controlado principalmente por fenómenos de difusión. Por lo tanto para estudiar la cinética de liberación se emplea el modelo matemático de difusión descrito por la ley de Fick, la cual se define matemáticamente como (Sáez *et al.*, 2004):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left(\frac{Dt}{\pi d^2} \right)^{1/2} \quad (\text{Ecuación 16})$$

En donde M_t/M_∞ es la fracción de fármaco liberado, t es el tiempo, D es el coeficiente de difusión del fármaco desde el hidrogel y d es el espesor de la muestra polimérica. Esta ecuación es válida para sistemas isotrópicos, en donde las propiedades de la difusión son las mismas en cualquier punto del sistema. Una ecuación más general para los estudios de liberación se puede deducir a partir de la segunda ley de Fick, la cual se puede emplear en periodos de tiempo cortos y para hidrogeles con formas geométricas como pastillas, cilindros y esferas:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (\text{Ecuación 17})$$

En la Ecuación 17, n es el modo de transporte del fármaco y k la constante del sistema polímero-disolución. Cuando n tiene un valor de 0.5 la liberación del fármaco sigue el mecanismo de difusión Fickiano y se puede estudiar mediante la Ecuación 16. Cuando n es diferente a 0.5, el mecanismo de difusión se considera no Fickiano o anómalo y si n es igual a 1, se considera que sigue el mecanismo de difusión de Schott (Katime *et al.*, 1999). Utilizando los valores de concentración

obtenidos durante el proceso de liberación desde los hidrogeles y la Ecuación 17, se construyó la gráfica de la Figura 43. En ésta se observa que tanto los hidrogeles obtenidos con glutaraldehído como los obtenidos con ácido glutárico describen el mismo comportamiento durante la liberación del fármaco. La concentración del fármaco alcanza una alta concentración en la solución durante los primeros 300 minutos, luego aumenta a su valor máximo, donde permanece constante durante el tiempo restante del estudio.

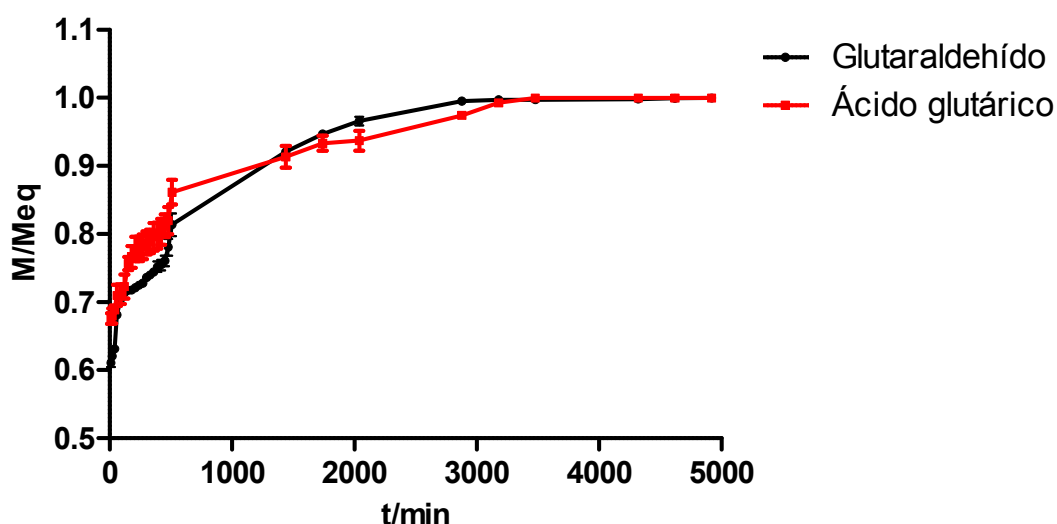


Figura 43. Cinética de liberación de betahistina desde los hidrogeles de quitosano.

Para conocer el mecanismo de difusión de la liberación, se aplica el logaritmo natural a ambos lados de la ecuación 17 para obtener la Ecuación 18 y analizar la linealidad de la gráfica.

$$\ln\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = \ln k + n \cdot \ln t \quad (\text{Ecuación 18})$$

De acuerdo a la anterior expresión, se grafica $\ln(M_t/M_\infty)$ en función de $\ln t$ como se muestra en la Figura 44; en esta gráfica se observa un comportamiento lineal durante las primeras horas de la liberación, lo cual representa un proceso de

liberación controlado por el fenómeno de difusión conocido como comportamiento Fickiano. Este resultado concuerda con estudios previos en los que se ha demostrado que la difusión de moléculas pequeñas desde polímeros elastoméricos en estado hinchado es de tipo Fickiano (Katime *et al.*, 1999); sin embargo, para las últimas horas de liberación se pierde la linealidad y el proceso se hace anómalo. Este comportamiento puede ser producido por el aumento en el recorrido de difusión de las moléculas de fármaco que se encuentren en el centro de la matriz polimérica, perdiéndose la isotropía del sistema que es una condición fundamental para ajustarse al modelo de Fick.

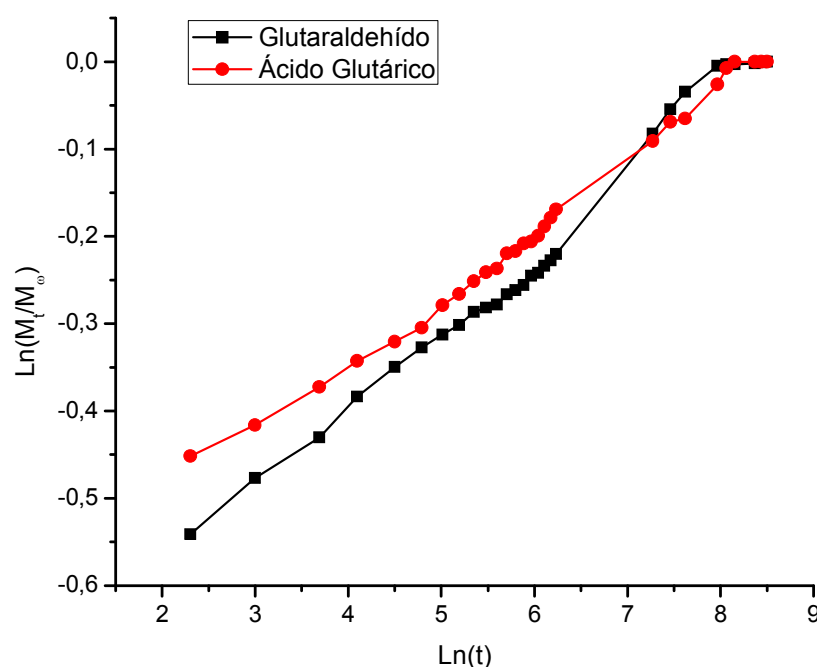


Figura 44. Representación de $\ln(M_t/M_\infty)$ en función de $\ln t$, para la liberación de Betahistina desde los hidrogeles de quitosano en equilibrio de hinchamiento.

7.9 Estudio de degradación hidrolítica

En la Figura 45 se presenta la degradación de los hidrogeles de quitosano bajo condiciones fisiológicas simuladas. Se observa una tendencia en aumento para la pérdida de peso de la muestra a medida que transcurren los días. Sin embargo,

cuando se cumplió un mes de estudio las muestras solo habían perdido un 37% de su peso inicial para las muestras entrecruzadas con glutaraldehído y un 35% para las entrecruzadas con ácido glutárico. Este índice de degradación bajo se debe a la presencia del entrecruzamiento covalente de las cadenas de quitosano como se ha observado en estudios previos (Costa-Junior *et al.*, 2009), donde la degradación hidrolítica para las muestras con alto grado de entrecruzamiento fluctuó entre 30 y 50%. Se tiene claro además que la pérdida de peso está asociada a procesos de solvatación y depolimerización de las cadenas de quitosano, que van erosionando el material. Asumiendo un comportamiento lineal para el proceso de degradación, se requieren aproximadamente 2.8 meses para alcanzar la degradación completa del material polimérico. Este comportamiento resulta conveniente para aplicaciones como vendajes reabsorbibles en quemaduras, donde se requiere una degradación progresiva a mediano plazo, que permita la regeneración de los tejidos.

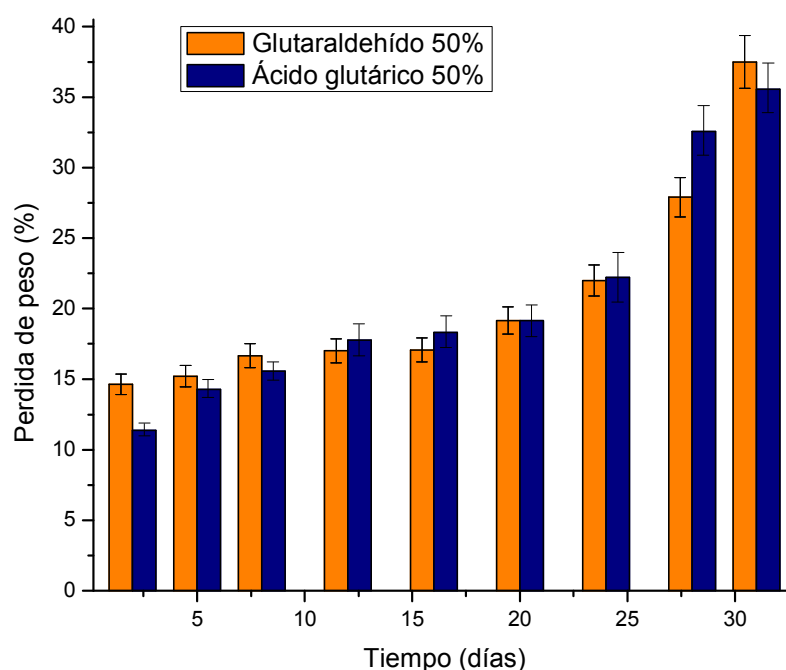


Figura 45. Pérdida de peso en función del tiempo luego de la degradación hidrolítica de los hidrogeles de quitosano.

7.10 Estudios de biocompatibilidad *in vivo*

Los materiales implantados se dejaron durante 21 días con el fin de realizar una prueba piloto de biocompatibilidad. Se fijó este número de días ya que de acuerdo a la literatura, el quitosano se degrada en un lapso de 15 a 30 días dependiendo de factores como el grado de desacetilación, el peso molecular y el modo de implantación (Khor, 2001). Como se observa en la Figura 46-A las muestras de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído se reabsorbieron por completo, observándose una dermis completamente sana, sin ningún tipo de inflamación o necrosis. Durante el periodo de estudio no se presentó ninguna respuesta adversa para la interacción entre el material implantado y el tejido de la piel, es decir que el material no generó una respuesta a cuerpo extraño y mostró indicios de biocompatibilidad. Es importante resaltar este resultado ya que pese al efecto citotóxico asociado al glutaraldehído (no se ha demostrado que sea cancerígeno), los grupos formilos de este agente entrecruzante se encuentran bloqueados formando enlaces tipo imina con el quitosano, lo que le confiere el carácter biocompatible como se había demostrado previamente mediante pruebas *in vitro* (Costa-Junior *et al.*, 2009), y se corrobora mediante el estudio *in vivo* realizado en este trabajo.

Aunque el quitosano no es generado de forma natural por la especie animal en estudio, se sabe de antemano que existen enzimas como la quitinasa y la lisozima, que son liberadas por los macrófagos y que tienen la capacidad para llevar a cabo la biodegradación tanto de la quitina como del quitosano (Boot *et al.*, 1995). Adicionalmente, se conoce la existencia de la enzima quitin-deacetilasa, que remueve los grupos acetilos remanentes en la cadena de quitosano, para que posteriormente este último sea hidrolizado hasta su unidad monomérica, la glucosamina. Esta última pasa a formar glicosaminoglicanos, los cuales están presentes en las matrices extracelulares de los tejidos y tienen como función organizar y dar funcionamiento adecuado a la matriz extracelular (Sánchez *et al.*, 2007).



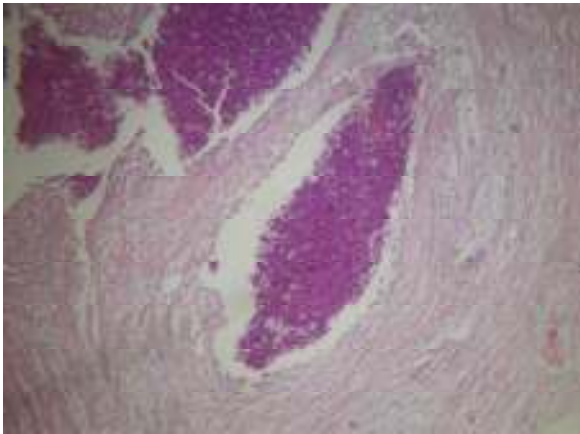
(A)



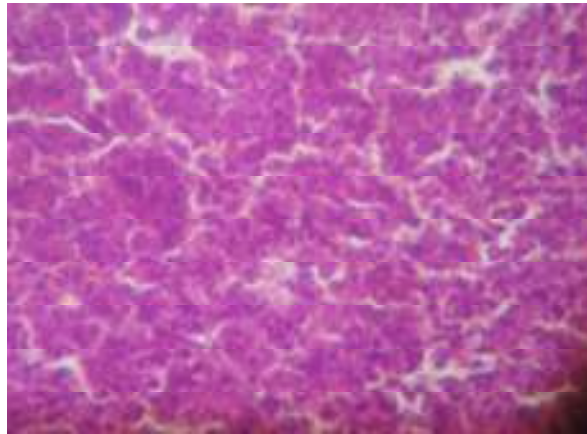
(B)

Figura 46. Recuperación de las muestras y tejido conectivo circundante. (A) Hidrogel quitosano-glutaraldehído; (B) Hidrogel quitosano-ácido glutárico.

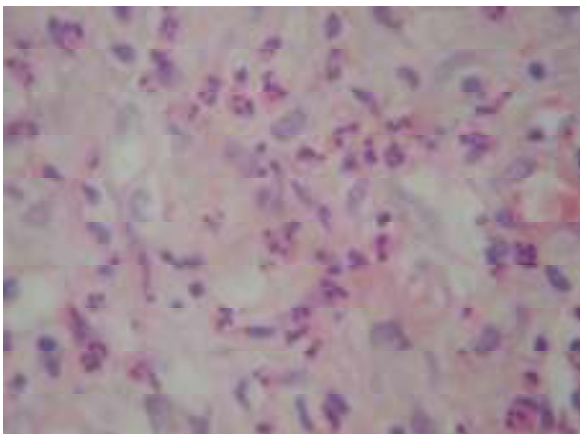
Por otra parte, en la Figura 46-B se observa la dermis en la cual se implantaron muestras de quitosano entrecruzado con ácido glutárico, en este caso se observa una reacción a cuerpo extraño que conlleva al encapsulamiento del material polimérico mediante un tejido fibroso, como se muestra en la Figura 47-A del estudio histológico.



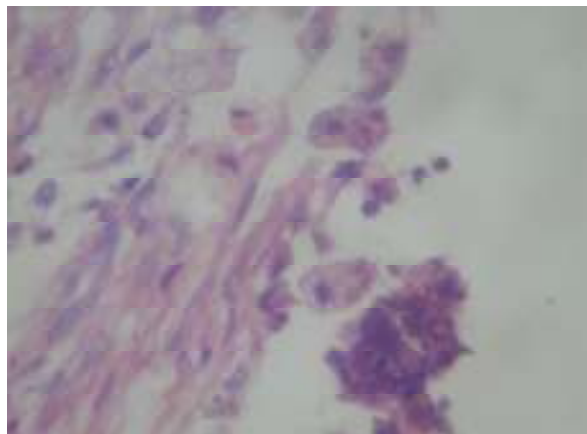
(A)



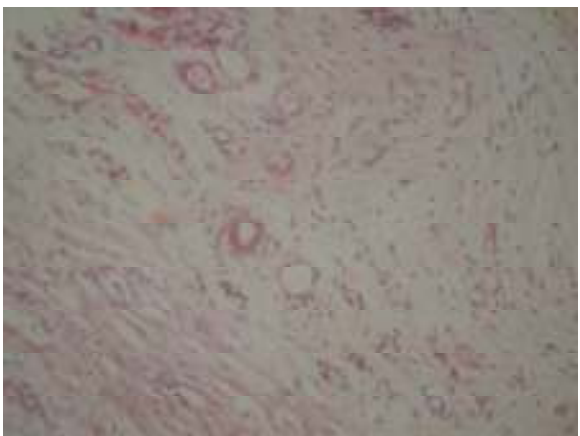
(B)



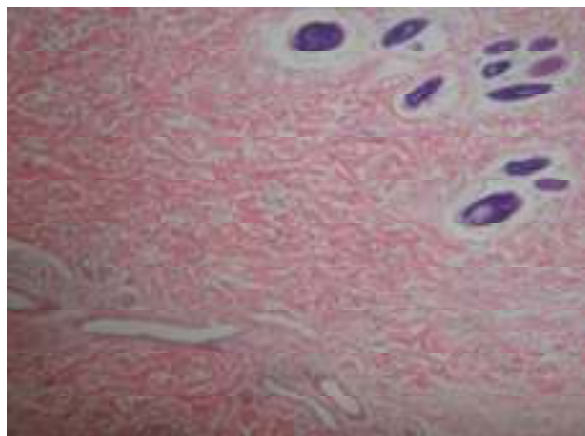
(C)



(D)



(E)



(F)

Figura 47. Estudio histológico de las muestras de piel implantada con hidrogeles de quitosano-ácido glutárico.

El análisis histológico muestra además que el material está siendo infiltrado por células mononucleadas y granulocitos (Figuras 47-B y 47-C). En la Figura 47-D se observa la presencia de macrófagos por lo que se hace evidente la biodegradación del material polimérico con una inflamación aguda. Alrededor del cuerpo extraño se observa tejido conectivo denso no modelado y moderada cantidad de vasos sanguíneos (Figuras 47-E y 47-F). Los neutrófilos representan un 70%, eosinófilos 10%, linfocitos 10%, macrófagos 10% y plasmotocitos 1%.

8. CONCLUSIONES

Se logró optimizar a escala de laboratorio el proceso de extracción de quitosano a partir del hongo *Aspergillus niger* generado por la empresa Sucromiles S.A. El aumento en el porcentaje de rendimiento a valores cercanos al 7% frente a los reportados previamente en el literatura (1.07-3.83%), la disminución en costos energéticos y la minimización de las cantidades empleadas, hacen atractiva esta metodología como fuente alternativa de quitosano, dándole un valor agregado a un subproducto industrial ampliamente disponible en la región durante todo el año.

Al quitosano extraído se le realizó una completa caracterización estructural mediante espectroscopia IR y RMN en solución y en estado sólido. Éste presentó además un peso molecular viscoso de 1.90×10^5 g/mol (clasificándose como un quitosano de bajo peso molecular) y un grado de desacetilación del 77.3%. El contenido de nitrógeno de acuerdo al análisis elemental fue de 6.88% en promedio. El análisis térmico mostró para el quitosano extraído una temperatura de transición vítrea alrededor de 125 °C y una estabilidad térmica hasta los 266 °C.

Se sintetizaron y caracterizaron hidrogeles de quitosano mediante el entrecruzamiento químico de sus cadenas con dialdehídos mediante la formación de enlaces tipo imina y ácidos dicarboxílicos mediante la formación de enlaces tipo amida, estos últimos con la ayuda de la carbodiimida como agente de condensación. Los hidrogeles obtenidos con los ácidos dicarboxílicos presentaron una mayor estabilidad térmica frente a los hidrogeles obtenidos con los dialdehídos, comportamiento atribuido a la generación de enlaces de hidrógeno que promueven el entrecruzamiento físico entre las cadenas del quitosano.

Los datos obtenidos durante los estudios de hinchamiento mostraron que los hidrogeles sintetizados presentan una cinética de hinchamiento de segundo orden.

Para el caso de los hidrogeles obtenidos con glutaraldehído se observó la influencia que tiene el porcentaje de entrecruzamiento en el proceso de hinchamiento del material. A medida que se incrementa el grado de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, disminuye el grado de hinchamiento. Este comportamiento es confirmado con los resultados obtenidos mediante las micrografías electrónicas de barrido, donde se pudo ver intersticios más grandes para los hidrogeles con menor grado de entrecruzamiento, que permiten una mayor entrada de agua a la matriz polimérica.

Los hidrogeles sintetizados presentaron una respuesta de hinchamiento selectiva dependiendo del pH del medio; a valores de pH ácidos el material alcanzó el mayor grado de hinchamiento, mientras que a valores de pH neutros o básicos, el hinchamiento disminuyó considerablemente. A pH 11.0 el material presentó un grado de hinchamiento mínimo.

El estudio cinético de liberación de Betahistina desde los hidrogeles en equilibrio de hinchamiento, mostró un mecanismo de difusión Fickiano para las primeras horas del estudio, posteriormente el proceso se vuelve anómalo y deja de estar gobernado únicamente por los procesos de difusión.

Bajo condiciones fisiológicas simuladas, los hidrogeles mostraron una degradación progresiva, perdiendo apenas el 37% de su peso inicial durante un mes de estudio. Esto se debe al entrecruzamiento químico de las cadenas poliméricas y a la ausencia de enzimas en el medio simulado.

De acuerdo al estudio *in vivo* realizado, los hidrogeles preparados con glutaraldehído como agente entrecruzante se reabsorbieron por completo y mostraron ser biocompatibles al no afectar el tejido tisular luego de 21 días de estudio. Este resultado fue consecuente con estudios realizados *in vitro* anteriormente, pese a que se está usando un aldehído difuncional catalogado como tóxico.

Para los hidrogeles generados con ácido glutárico, se observó una clara respuesta a cuerpo extraño, aislando el material implantado mediante una fibrosis y generando una inflamación aguda, procesos que demuestran una baja biocompatibilidad del material. Sin embargo, el material estaba siendo biodegradado mediante procesos como la fagocitosis.

9. PERSPECTIVAS

En este trabajo se logró aislar el complejo quitina-glucano, el cual puede ser usado para la generación de hidrogeles físicos mediante quelación de metales. Este complejo también puede ser funcionalizado para mejorar su solubilidad tanto en agua como en solventes orgánicos y por ende ampliar su aplicabilidad.

Optimizar el proceso de extracción de quitosano a partir de *Aspergillus niger* en planta piloto para aproximar esta metodología a la escala industrial.

Implementar procesos de extracción enzimática de quitosano a partir de *Aspergillus niger* y evaluar la relación costo/beneficio frente al proceso químico.

Aprovechando la alta reactividad del grupo amino del quitosano, se pueden evaluar nuevos agentes entrecruzantes que permitan obtener hidrogeles biocompatibles y biodegradables.

Sintetizar hidrogeles de quitosano a escala nanométrica y funcionalizarlos con biomoléculas que permitan hacer liberación de fármacos de una manera controlada y dirigida al mismo tiempo.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

Los resultados parciales de este trabajo fueron presentados en los siguientes eventos:

- Simposio Latinoamericano de Polímeros. Julio 2010, San José, Costa Rica.
- Congreso Latinoamericano de Química. Octubre 2010, Cartagena, Colombia.
- European Polymer Congress. Junio 2011, Granada, España.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Fattah, W., Jiang, T., El-Bassyouni, G., Laurencin, C. *Acta Biomater*, **2007**, 3, 503-514
- Abdou, E., Nagy, K., Elsabee, M. *Bioresource Technol*, **2008**, 99, 1359-1367
- Agrawal, G.K., Rakwal, R., Tamogami, S. *Plant Physiol Biochem*, **2002**, 40, 1061-1069
- Allen, P., Benett, D., Williams, D. *Eur Polym J*, **1992**, 28, 347-352
- Al-Musa, S., Abu Fara, D., Badwan, A.A. *J Control Release*, **1999**, 57, 223-232
- Bajpai, S.K., Dubey, S. *React Funct Polym*, **2005**, 62, 93-104
- Bajaj, M., Winter, J., Gallert, C. *Biochem Eng J*, **2011**, 56, 51-62
- Balanta, D., Grande, C., Zuluaga, F. *Rev Iberoam Polim*, **2010**, 11, 297
- Bashaw, R.N., Harpe, B. G. *US Patent* 3 229 769, **1966**
- Beaney, P., Lizardi-Mendoza, J., Healy, M. *J Chem Technol Biotechnol*, **2005**, 80, 145-150
- Bhat, S., Keshavayya, J., Kulkarni, V.H., Reddy, V.K., Kulkarni, P., Kulkarni, A. *J Appl Polym Sci*, **2012**, 125, 1736-1744
- Bhavani, K., Dutta, P. *Am Dyestuff Rep*, **1999**, 88, 53-58
- Blanco, M., Rego, J., Huglin, M. *Polymer*, **1994**, 35, 3487-3491
- Bodnar, M., Hartmann, J.F., Borbely, J. *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 2521-2527
- Boot, R.G., Renkema, H., Strijland, A., Zonneveld, A.J., Aerts, J.M. *J Biol Chem*, **1995**, 270, 26252-26256
- Bornet, A., Teissedre, P.L. *Eur Food Res Technol*, **2008**, 226, 681-689
- Cai, J., Yang, J., Du, Y., Fan, L., Qiu, Y., Li, J., Kennedy, J.F. *Carbohydr Polym*, **2006**, 64, 151-157
- Carhuapoma, W., Santiago, J. *Rev Iberoam Polim*, **2005**, 6, 333-346
- Chatterjee, S., Adhya, M., Guha, A.K., Chatterjee, B.P. *Process Biochem*, **2005**, 40, 395-400
- Chen, L.G., Liu, Z.L., Zhuo, R.X. *Polymer*, **2005**, 46, 6274-6281
- Costa-Junior, E., Pereira, M., Mansur, H. *J Mater Sci: Mater Med*, **2009**, 20, 553-561

Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C., Alhaique, F. *J Control Release*, **2007**, 119, 5–24

Cundumí, N., Arango, J. Diseño del proceso de obtención de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus Níger*, subproducto en la industria del ácido cítrico. Santiago de Cali. **1994**. Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad del Valle. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química

Domard, A. *Carbohydr Polym*, **2011**, 84, 696–703

Dong, Y., Ruan, Y., Wang, H., Zhao, Y., Bi, D. *J Appl Polym Sci*, **2004**, 93, 1553-1558

Dos Santos, Z., Caroni, A., Pereira M, Da Silva, D., Fonseca, J. *Carbohydr Res*, **2009**, 344, 2591-2595

Dutta, P., Dutta, J., Tripathi, V. *J Sci Ind Res*, **2004**, 63, 20-31

Drury, J.L., Dennis, R.G., Mooney, D.J. *Biomaterials*, **2004**, 25, 3187-3199

Dusek, K., Patterson, D. *J Polym Sci, Part A-2*. **1968**, 6, 1209-1216

El-Sherbiny, I., Lins, R., Abdel-Bary, E., Harding, D. *Eur Polym J*, **2005**, 41, 2584-2591

Escobar, J., Zaldivar, D., Katime, I. *Rev Iberoam Polim*, **2001**, 1, 35

Eustace, D., Siano, D., Drake, E. *J Appl Polym Sci*, **1988**, 35, 707-716.

Feofilova, E.P. *Microbiology*, **2010**, 79(6), 711–720

Feofilova, E.P., Nemtsev, D.V., Tereshina, V.M., Memorskaya, A.S. *Appl Biochem Micro*, **2006**, 42, 545–549

Friends, G., Kunzler, J., McGee, J. *J Appl Polym Sci*, **1993**, 49, 1869-1876.

García, D., Escobar, J., Noa, Y., Bada, N., Hernáez, E., Katime, I. *Eur Polym J*, **2004**, 40, 1637-1643

Gil, E.S., Hudson, S.M. *Progress Polym Sci*, **2004**, 29, 1173-1222

Gooday, G. *Mycol Res*, **1995**, 99(4), 385-394

Gooday, G. *J Appl Bacteriol*, **1993**, 74, 12-20

Guerrero-Ramírez, L.G., Nuño-Donlucas, S.M., Cesteros, L.C., Katime, I. *Mater Chem Phys*, **2008**, 112, 1088–1092

Guinesi, L.S., Calvaheiro, E.T. *Thermochim Acta*, **2006**, 444, 128-133

Haper, B.G., Bashaw, R.N., Atkins, B.L. *US Patent* 3 669 103, **1972**

Harmon, C. *US Patent* 3 670 731, **1972**

Heux, L., Brugnerotto, J., Desbrières, J., Versali, M.F., Rinaudo, M. *Biomacromolecules*, **2000**, 1, 746-751

Hirokawa, Y., Tanaka, T. *J Chem Phys*, **1987**, 87, 1392-1395

Huglin, M., Rego, J. *Macromolecules*, **1990**, 23, 5359-5361

Ishihara, M., Obara, K., Nakamura, S., Fujita, M., Masuoka, K., Kanatani, Y., Takase, B., Hattori, H., Morimoto, Y., Ishihara, M., Maehara, T., Kikuchi, M. *J Artif Organs*, **2006**, 9, 8-16

Islam, M., Khan, S., Tanaka, M., *Mar Pollut Bull*, **2004**, 49, 103

Jain, S., Jain, A., Gupta, Y., Ahirwar, M. *Pharm Sci Tech*, **2007**, 8, 1-8

Jarry, C., Chaput, C., Chenite, A., Renaud, M.A., Buschmann, M., Leroux, J.C. *J Biomed Mater Res*, **2001**, 58, 127

Jayakumar, R., Prabakaran, M., Kumar, P.T., Nair, S.V., Tamura, H. *Biotechnol Adv*, **2011**, 29, 322-337

Jeuniaux, C., *Advances in Chitin*: 1, A. Domard, C. Jeuniaux, R. Muzzarelli, G. Roberts, eds., Jacques Andre Publishers, Lyon, France, **1996**. 1-9

Johnson, R.M., Mwaikambo L.Y., Tucker, N. *Rapra Review Reports: Biopolymers*, **2003**, 14, 3-26

Kaifu, K., Nishi, N., Komai, T., Tokura, S., Somorin, O. *Polym J*, **1981**, 13, 241-245

Kasaai, M.R. *Carbohydr. Polym*, **2007**, 68, 477-488

Katchalsky, A., Michaeli, L. *J Polym Sci*, **1955**, 15, 69-86

Katime, I., Novoa, R., Apodaca, D. *Polym Test*, **1999**, 18, 559-566

Katime, I. *Rev Iberoam Polim*, **2000**, 5, 10-30

Katime, I., Rodríguez, E. *J Macromol Sci*, **2001**, 38, 543-558

Khare, A., Peppas, N. *Biomaterials*, **1995**, 16, 559-567

Khor, E. *Chitin: Fulfilling a Biomaterials Promise*. Elsevier Science & Technology, **2001**, 1-20

Kim, S.J., Kang, S.Y., Park, S.L. *Korean J Food Sci Technol*, **1998**, 30, 693-696

Kim, Se-Kwon. *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives*. CRC Press Taylor & Francis Group. **2011**

- Kogan, G., Rauko, P., Machová, E. *Carbohydr Res*, **2003**, 338, 931-935
- Korsmeyer, R.W., Peppas, N.A. *J Membr Sci*, **1981**, 9, 211-227
- Kučera, J. *J Chromatogr B*, **2004**, 808, 69-73
- Kuhn, W., Katchalsky, A., Hargitay, B., Heisenberg, H. *Nature*, **1950**, 165, 514-516
- Kumar, P., Dutta, J., Tripathi, V.S. *J Sci Ind Res*, **2004**, 63, 20-31
- Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., Stepnowski, P., *Mar Drugs*, **2010**, 8, 1567-1636
- Kurita, K. *Mar Biotechnol*, **2006**, 8, 203-226
- Kurita, K., Inoue, S., Yamamura, K., Yoshino, H., Ishii, S., Nishimura, S.I. *Macromolecules*, **1992**, 25, 3791-3794
- Kurita, K., Hashimoto, S., Yoshino, H., Ishii, S., Nishimura, S.I. *Macromolecules*, **1996**, 29, 1939-1942
- Langer, R.S., Peppas, N.A. *J Macromol Sci Rev Macromol Chem Phys*, **1983**, 23, 61-126
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. *Biología de los microorganismos*. Pearson 10ed. Madrid.
- Majeti, N.V., Kumar, R. *React Funct Polym*, **2000**, 46, 1-27
- Martínez, G., Sánchez M., Madruga, E. *Rev Plastic Modern*, **1997**, 73(491), 437
- MedGarget. Novel Hydrogels for Tissue Repair, Regeneration. http://www.medgadget.com/archives/2007/07/novel_hydrogels_for_tissue_repair_regeneration_human_tissue.html.
- Meyer, K.H., Pankow, G.W. *Helv Chim Acta*, **1935**, 18, 589-598
- Mislovičová, D., Masárová, J., Bendžálová, K., Šoltés, L., Machová, E. *Ultrason Sonochem*, **2000**, 7, 63-68
- Miyoshi, H., Shimura, K., Watanabe, K., Onodera, K. *Biosci Biotechnol*, **1992**, 56, 1901-1905
- Muzzarelli, R.A. *Carbohydr Polym*, **2009**, 76, 167-182
- Muzzarelli R.A., *US patent*, 4,282,351, **1981**
- Muzzarelli, R.A. *Carbohydr Polym*, **2009**, 77, 1-9
- Nakajima, N., Ikada, Y. *Bioconjugate Chem*, **1995**, 6, 123-130

- Nud'ga, L.A., Petrova, V.A., Kever, E.E., Makarova, T.V. *Russ J Appl Chem*, **2002**, 75, 1864-1867
- Nwe, N., Chandkrachang, S., Stevens, W., Maw, T., Tan, T., Khor, E., Wong, S. *Carbohydr Polym*, **2002**, 49, 235-237
- Nwe, N., Stevens, W., Tokura, S., Tamura, H. *Enzyme Microb Technol*, **2008**, 42, 242-251
- Nwe, N., Furuike, T., Osaka, I., Fujimori, H., Kawasaki, H., Arakawa, R., Tokura, S., Stevens, W., Kurozumi, S., Takamori, Y., Fukuda, M., Tamura, H. *Carbohydr Polym*, **2011**, 84, 743-750
- Okano, T., Bae, Y.H., Jacobs, H., Kim, S.W. *J Control Release*, **1990**, 11, 255-265
- Orozco, Y. Obtencion de quitosano reticulado con propiedades para la inmovilización de celulasas y pectinasas y su aplicación en continuo a escala de laboratorio. Santiago de Cali. **2007**. Tesis de Maestría (Química). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química
- Parada, L.G., Crespín, G.D., Miranda, R., Katime, I. *Rev Iberoam Polim*, **2004**, 5, 1-16
- Parejo, C., Ortiz, C., Vázquez, B., Gallardo, A., San Román, J. *Rev Plastic Modern*, **1998**, 75, 96
- Peppas, N.A., Bures, P., Leobandund, W., Ichikawa, H. *Eur J Pharm Biopharm*, **2000**, 50, 27-46
- Peppas, N.A., Mikos, G. Preparation methods and structure of hydrogels, en: *Hydrogels inmedicine and pharmacy*, **1986**, vol. 1, CRC Press, FL, pp 5-25
- Peppas, N.A. *Int J Pharm*, **2004**, 277, 11-17
- Pititsen, O., Eizner, E. *Biophysics*, **1965**, 10, 3
- Rojas, O., Moya, M., Sibaja, M., Ruepert, C., Vega-Baudrit, J. *Rev Iberoam Polim*, **2004**, 5, 133
- Sáez-Martínez, V., Pérez-Álvarez, L., Merrero, M.T., Hernáez, E., Katime, I. *Eur Polym J*, **2008**, 44, 1309-1322
- Sáenz, V. *Rev Iberoam Polim*, **2003**, 4, 24
- Sáez, V., Hernáez, E., Sanz, L. *Rev Iberoam Polim*, **2004**, 5, 55
- Sakurai, K., Maegawa, T., Takahashi, T. *Polymer*, **2000**, 41, 7051-7056
- Sánchez, F., Katime, I., Novoa, R., Apodaca, H. *Ing & Inves*, **1996**, 106

- Sánchez, A., Sibaja, M., Vega-Baudrit, J., Madrigal S. *Rev Iberoam Polim*, **2007**, 8, 241-267
- Sarmiento, B., Ribeiro, A., Veiga, F., Sampaio, P., Neufeld, R., Ferreira, D. *Pharm Res*, **2007**, 24, 2198-2206
- Shibayama, M., Tanaka, T. *Adv Polym Sci*, **1993**, 109, 1-62
- Siracusa, V., Rocculi, P., Romani S., Dalla, M. *Trends Food Sci Technol*, **2008**, 19, 634-643
- Skorik, Y., Pestov, A., Yatluk, Y. *Bioresource Technol*, **2010**, 101, 1769-1775
- Somorin, O., Nishi, N., Tokura, S., Noguchi, J. *Polym J*, **1979**, 11, 391-396
- Suyatma N. E. Developpement de Films biodegradables a base de chitosane: etudes du Mélange chitosane/PLA, de la plastification et de la compatibilisation. Tesis para la obtención del grado de doctor en química de los materiales. Universidad de REIMS, Francia. 16 de junio de **2006**
- Synowiecki, J., Abdul, N.A. *Food Chem*, **1997**, 60, 60-610
- Tajdini, F., Amini, M.A., Nafissi-Varcheh, N., Faramarzi, M.A. *Int J Biol Macromol*, **2010**, 47, 180-183
- Tamura, H., Nagahama, H., Tokura, S. *Cellulose*, **2006**, 13, 357-364
- Tanaka, T. *Phys Rev Lett*, **1978**, 40, 820-823
- Tanaka, T., Fillmore, D., Sun, S., Nishio, L., Swislow, G., Shah, A. *Phys Rev Lett*, **1980**, 45, 1636-1639
- Tang, Y., Singh, J., *Int J Pharm*, **2009**, 365, 34-43
- Tayel, A., Moussa, S., El-Tras, W., Elguindy, N., Opwis, K. *Int J Biol Macromol*, **2011**, 49, 241-245
- Tokura, S., Nishimura, S.I., Nishi, N. *Polym J*, **1983**, 15, 597-602
- Trujillo, R. *Carbohydr Res*, **1968**, 7, 483-485
- Van Dijk-Wolthuis, W., Tsang, S., Van Steenberg, M., Hoogeboom, C., Hennink, W. *Macromolecules*, **1997**, 30, 4639-4645
- Wang, Y.C., Lin, M.C., Wang, D.M., Hsieh, H.J. *Biomaterials*, **2003**, 24, 1047-1057
- White, S., Farina, P., Fulton, I. *Appl Environ Micro*, **1979**, 38, 323-328
- Wichterle, O. Encyclopedia of Polymer Science and Technology. New York: N.M. Bikales, Interscience, **1971**, p 273
- Wichterle, O., Lim, D. *Nature*, **1960**, 185, 117-118

Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F.A., Conway, F.A., Sams, C.E. *J Agric Food Chem*, **2005**, 53, 3888-3894

Yusof, N.L., Wee, A., Lim, L.Y., Khor, E. *J Biomed Mater Res A*, **2003**, 66A, 224-232

Zhao, X.M., She, X.P., Yu, W.T. *J Plant Pathol*, **2007**, 89, 69-79

Zhu, A., Zhang, M., Wu, J., Shen, J. *Biomaterials*, **2002**, 23, 4657-4665

Zugenmaier, P. Crystalline Cellulose and Derivatives: Characterization and Structures. Springer Series in Wood Science, **2008**, 7-45