



# Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

# **PREPARACIÓN DE MATERIALES BIOCOMPUESTOS A PARTIR DE QUITOSANO CON APLICACIONES BIOMÉDICAS**

TESIS DOCTORAL para optar por el título de DOCTOR EN QUÍMICA de  
la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

**Virginia Soledad Pasotti**

DIRECTORA DE TESIS: Dra. MARISA MARTINELLI

CO-DIRECTORA: Dra. ADELAI DA ÁVILA

Comodoro Rivadavia

Diciembre 2022

*El único propósito de la Existencia humana  
es encender una luz  
en la oscuridad del mero Ser  
C.G.JUNG*

*Cualquier destino, por largo y complicado que sea, consta en realidad  
de un solo momento: el momento en que el hombre sabe para siempre  
quién es.  
J.L BORGES*

*A mis hijos, a mis padres, a mi compañero, a mí.*

## *Agradecimientos*

*Es difícil expresar por escrito el agradecimiento a todas esas personas que han colaborado de alguna manera para la realización de esta tesis. El trabajo científico es interdisciplinario y no puede concluirse satisfactoriamente sin interactuar de forma humana, profesional, académica y científica con muchas otras personas.*

*El trabajo de laboratorio, los viajes, el intercambio con otros grupos de investigación, el apoyo familiar y la perseverancia son fundamentales para avanzar.*

*Por ello es que este espacio de agradecimiento comienza recordando a aquellos/as a quienes he escuchado, de quienes he aprendido y me asistieron, sostuvieron en este camino para que observara y accionara en pos de llevar a cabo este trabajo, especialmente a:*

*Mis hijos que transitaron conmigo estos años de trabajo, acompañándome incluso en los viajes.*

*A mi directora de Tesis, la Dra Marisa Martinelli de la UNC que aceptó dirigirme y guiarme en este trayecto.*

*A mi co-directora de Tesis, la Dra Adelaida Avila de la UNPSJB, con quien compartimos también proyectos de investigación y docencia hace 25 años.*

*A la Dra Isella Gutierrez, por aceptar la co-dirección de la beca CONICET.*

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de la Beca CIT para la realización de este trabajo.*

*A la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco por la posibilidad de cursar mi carrera de Doctorado en Química.*

*A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNPSJB por los subsidios facilitados.*

*A la Universidad Nacional de Córdoba por permitirme realizar pasantías de trabajo de laboratorio.*

*A la Secretaria de Ciencia y Tecnología, SECyT UNC-Córdoba-Argentina por su ayuda económica a través de los fondos FONCyT*

*A la Dra Karina Buerbauer de la UNC- INSTITUTO CEPROCOR-CONICET- Córdoba-Argentina. Por su aporte y cordialidad al recibirme en el instituto para realizar tareas de laboratorio.*

*Al Grupo de Polímeros de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Especialmente al Dr. Sergio David García Schejtman por su aporte y guía durante mis pasantías de trabajo en la universidad de Córdoba.*

*A la Dra Cecilia Crovetto y la Bioqca. Vanesa Álvarez, por su colaboración en la realización de la electroforesis en gel de poliacrilamida. FCNyCS. UNPSJ-Comodoro Rivadavia-Chubut-Argentina*

*A la Dra Graciela Pucci, por la colaboración en la realización de los espectros infrarrojos.*

*A la Bioquímica Hilda Nieres, del Laboratorios de Microbiología y Hemoderivados de la UNC.*

*A la Bioqca Marcia Bernaldo de Quiroz del Hospital Regional de Comodoro Rivadavia por la colaboración con los estudios microbiológicos realizados.*

*Al Sr. Roque Silva patrón del barco pesquero Juan Manuel quien colaboró con los ejemplares de langostinos empleados en este trabajo. A la Mg Susana Riso, quien nos contactó con él.*

*A todas mis compañeras del grupo de investigación en Polímeros de Comodoro Rivadavia, por el apoyo mutuo en el trabajo diario: Cecilia, Ana, Marcela, Rosmarí, Yanina.*

*A la Dra Marta Diaz, directora de la carrera de Doctorado en Química, por su ayuda diaria y consejos.*

*A todos/as.....Gracias!*

## Índice General

Resumen	12
Abstract	15
Abreviaturas	18
Índice de Tablas y Figuras	20
Capítulo 1 – Introducción	256
1.1 Objetivo	266
1.2 Generalidades de la Ciencia de los Polímeros	266
1.2.1 Historia de los Polímeros	266
1.2.2 Polímeros naturales y sintéticos	277
1.3 Biopolímeros	288
1.3.1 Clasificación de biopolímeros según método de obtención	29
1.4.1 Origen y propiedades de la quitina	31
1.4.2 Origen, propiedades y usos de quitosano	33
1.4.3 Obtención de quitosano a partir de quitina	35
1.5 Aplicaciones biomédicas	36
1.5.1 Antecedentes del uso de polímeros en biomedicina	36
1.5.2 Uso de quitosano en biomedicina combinado con distintos materiales	39
1.5.2.1. Gelatina	40
1.5.2.2 Polivinilpirrolidona	41
1.5.2.3 Sorbitol	42
1.5.2.4 Genipín	43
1.5.2.5 Ácido Tánico	44
1.5.3 Soportes biomédicos utilizados como apósitos	44
1.6 Desarrollo sustentable	46
1.6.1 Biodegradación	47
1.6.2 Residuos costeros como cáscaras de crustáceos	48
1.7 Bibliografía	50
Capítulo 2 Capítulo 2 – Objetivos	58
2.1 Motivaciones	58
2.2 Objetivo General	59
2.3 Objetivos Específicos	59

Capítulo 3 Capítulo 3 – Materiales y Métodos	60
3.1 Objetivo	60
3.2 Reactivos	60
3.3 Materiales de vidrio	60
3.4 Equipos usados	61
3.5 Caracterización	61
3.5.1 Determinación por métodos espectroscópico	61
3.5.1.1 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier, FTIR	62
3.5.1.2 Reflectancia Total Interna Atenuada (ATR-FTIR)	63
3.5.1.3 Espectrofotometría UV-Visible	64
3.5.2 Propiedades Mecánicas	65
3.5.2.1 Fluencia	65
3.5.2.2 Relajación de Esfuerzos	65
3.5.2.3 Mecánico-Dinámicos	65
3.5.2.4 Características de la Curva Esfuerzo-Deformación	65
3.5.3 Propiedades de Transporte	68
3.5.3.1 Permeabilidad al vapor de agua	69
3.5.3.2 Índice de Hinchamiento	70
3.5.4 Determinación del Peso Molecular	71
3.5.5 Determinación del contenido de grupos amino	74
3.6 Bibliografía	77

Capítulo 4 – Obtención de Quitina y Quitosano	80
4.1 Objetivo	80
4.2 Introducción	80
4.3 Reseña de métodos utilizados	81
4.3.1 Etapas del procesamiento de la Quitina	82
4.3.1.1 Método químico	82
4.3.1.2 Método enzimático	83
4.3.2 Desacetilación de la quitina. Obtención de quitosano	84
4.4 Parte Experimental	85
4.4.1 Acondicionamiento del material	85
4.4.2 Método químico de extracción de quitina	86
4.4.3 Método enzimático de extracción de quitina	88
4.4.4 Desacetilación de quitina para obtención de quitosano	88
4.4.5 Caracterización del quitosano por FTIR	88
4.4.6 Determinación del Peso Molecular del quitosano	88
4.4.7 Determinación del Grado de Desacetilación	89
4.4.8 Preparación de <i>films</i> de quitosano	89
4.4.9 Caracterización de los <i>films</i>	90
4.4.10 Determinación del Índice de Hinchamiento	90
4.4.11 Determinación de la Permeabilidad al vapor de agua	90
4.5 Resultados y Discusión	90
4.5.1 Obtención de quitina y quitosano	90
4.5.1.1 Método químico	91
4.5.1.2. Método enzimático	93
4.5.2 Obtención de quitosano por desacetilación de la quitina	97
4.5.3 Caracterización del quitosano de langostino	99
4.5.3.1 Espectroscopía Infrarroja FTIR	99
4.5.3.2 Peso Molecular Viscosimétrico	103
4.5.3.3 Grado de Desacetilación	101
4.5.4 Preparación de <i>films</i>	103
4.5.4.1 Caracterización de los <i>films</i>	103
4.5.4.1.1 Espectroscopia FTIR	103
4.5.4.1.2 Índice de Hinchamiento de los <i>films</i>	104
4.5.4.1.3 Permeabilidad al vapor de agua de los <i>films</i>	105
4.6 Conclusiones parciales	106
4.7 Bibliografía	107

Capítulo 5 -	
Síntesis y caracterización de soportes poliméricos de quitosano con otros polímeros naturales y semisintéticos	111
5.1 Objetivo	111
5.2 Introducción	111
5.3 Parte Experimental	114
5.3.1 Síntesis y caracterización de <i>films</i> de quitosano con diferentes compuestos	114
5.3.1.1 <i>Films</i> de GEA	114
5.3.1.2 <i>Films</i> de Qhc-GEA-Ce <sup>+3</sup> y Qhl-GEA-Ce <sup>+3</sup>	114
5.3.2 Agregado de plastificantes y entrecruzantes	114
5.3.2.1 Variación de la concentración de Gen	115
5.4 Resultados y Discusión	115
5.4.1 <i>Films</i> GEA, Qhc-GEA-Ce <sup>+3</sup> y Qhl-GEA-Ce <sup>+3</sup>	115
5.4.1.1 Caracterización FTIR	116
5.4.2 <i>Film</i> con PVP, Sor y Gen	118
5.4.2.1 <i>Films</i> con PVP. Preparación y caracterización por FTIR	119
5.4.2.2 <i>Films</i> con Sorbitol. Preparación y caracterización por FTIR	11200
5.4.2.3 <i>Films</i> con Gen. Preparación y caracterización por FTIR	11233
5.4.2.3.1 Variación de la concentración agregada de Gen	125
5.4.3 Determinación de las Propiedades de Transporte	126
5.4.3.1 Determinación de Permeabilidad al vapor de agua	11266
5.4.3.2 Determinación de Índice de Hinchamiento	128
5.4.3.2.1 <i>Films</i> Qhc-GEA-Ce <sup>+3</sup> y Qhl-GEA-Ce <sup>+3</sup> con entrecruzantes	130
5.5 Conclusiones parciales	132
5.6 Bibliografía	134
Capítulo 6 - Síntesis de Biopolímeros	139
6.1 Objetivo	139
6.2 Introducción	139
6.2.1 Acido Tánico	139
6.2.2 Gelatina de pescado	140
6.2.2.1 Método de obtención de GP	141
6.2.3 Aceites Esenciales	142
6.3 Parte Experimental	143

6.3.1 Obtención y caracterización de Gelatina de Pescado	143
6.3.1.1 Acondicionamiento del material	143
6.3.1.2 Extracción de gelatina de pescado	144
6.3.1.3 Rendimiento Gravimétrico	144
6.3.1.4 Caracterización de la gelatina de pescado	145
6.3.1.5 Electroforesis SDS-Page	145
6.3.1.6 Determinación del Punto Isoeléctrico	148
6.3.2 <i>Films</i> de Qhl-GP-Ce <sup>+3</sup> y Qhc-GEA-Ce <sup>+3</sup>	148
6.3.3 <i>Films</i> de Qhl- GP-Gen-Ce <sup>+3</sup> y Qhc-GEA-Gen-Ce <sup>+3</sup>	149
6.3.4 <i>Films</i> de Qhl-AT-Ce <sup>+3</sup> y GP-ATox-Ce <sup>+3</sup>	150
6.3.4.1 Oxidación del AT	151
6.3.4.2 <i>Films</i> con diferentes concentraciones de AT	151
6.3.5 <i>Films</i> con incorporación de aceites esenciales	151
6.3.5.1 <i>Films</i> de GEA-ATox-CA y GEA-ATox-CL	152
6.3.5.2 <i>Films</i> de Qhc-AT-CA y Qhc-AT-CL	152
6.3.6 Ensayos de la capacidad antimicrobiana de los <i>films</i>	153
6.4 Resultados y Discusión	153
6.4.1 Obtención y caracterización de gelatina de pescado	153
6.4.1.1 Rendimiento Gravimétrico de la obtención de GP	154
6.4.2 Espectro FTIR de la GP	155
6.4.3 Electroforesis SDS-Page de la GP	156
6.4.4 Determinación del Punto Isoeléctrico de la GP	157
6.4.5 <i>Films</i> preparados	158
6.4.5.1 <i>Films</i> Qhc-GEA-Ce <sup>+3</sup> y Qhl-GP-Ce <sup>+3</sup>	158
6.4.5.2 <i>Films</i> Qhc-GEA-Gen-Ce <sup>+3</sup> y Qhl-GP-Gen-Ce <sup>+3</sup>	159
6.4.5.3 <i>Films</i> con AT como entrecruzante	159
6.4.5.4 <i>Films</i> con incorporación de aceites esenciales	160
6.4.6 Caracterización de los <i>films</i> preparados	161
6.4.6.1 Espectros FTIR de los <i>films</i> preparados	161
6.4.6.1.1 <i>Films</i> Qhl-GP-Ce <sup>+3</sup>	161
6.4.6.1.2 <i>Films</i> Qhl-GP-Gen-Ce <sup>+3</sup>	162
6.4.6.1.3 <i>Films</i> Qhc-AT-Ce <sup>+3</sup> y Qhl-AT-Ce <sup>+3</sup>	163
6.4.6.1.4 <i>Films</i> GEA-ATox-Ce <sup>+3</sup> y GP-ATox-Ce <sup>+3</sup>	165
6.4.6.1.5 <i>Films</i> con incorporación de Aceites Esenciales	167

6.4.6.2 Permeabilidad al Vapor de Agua	169
6.4.6.2.1 Influencia de la GP en la WVP	170
6.4.6.2.2 Influencia del entrecruzamiento en la WVP	171
6.4.6.2.3 Influencia del agregado de Aceites esenciales en la WVP	171
6.4.6.3 Índice de Hinchamiento	172
6.4.6.3.1 Influencia de la variación de la concentración de AT en el IH	176
6.4.6.3.2 Influencia del agregado de Aceites esenciales en el IH	177
6.4.6.4 Propiedades Mecánicas	178
6.4.6.5 Ensayos de capacidad antimicrobiana	182
6.5 Conclusiones parciales	183
6.6 Bibliografía	185
Capítulo 7 – Estudios de aplicación	191
7.1 Objetivo	191
7.2 Introducción	191
7.2.1 La Piel	191
7.2.2 Descripción general de una herida-quemadura	193
7.2.3 Efectos de las quemaduras	196
7.2.4 Tratamiento de las lesiones	198
7.2.5 Agregado de Heparina	198
7.2.6 Uso de Apósitos – Matrices poliméricas	200
7.2.7 Apósitos de quitosano	200
7.2.8 Sistemas de liberación controlada de drogas	20101
7.3 Parte Experimental	20202
7.3.1 Preparación de <i>films</i> con Heparina	20202
7.3.2 Determinación de Hep fijada	20303
7.3.3 Ensayos de liberación controlada de Hep	20404
7.4 Resultados y Discusión	20404
7.4.1 Inmovilización de Heparina	20404
7.4.2 Ensayos de liberación de Hep	20707
7.5 Conclusiones parciales	20909
7.6 Bibliografía	20910
<b>Conclusiones Finales</b>	<b>214</b>

## **RESUMEN**

Los biopolímeros son actualmente estudiados en el campo de la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa para ser utilizados en la fabricación de apósitos que contribuyan a la recuperación de los tejidos dañados. La quitina y el quitosano, como tales, pueden destinarse a interactuar con sistemas biológicos cumpliendo importantes roles en la salud humana. Las matrices poliméricas obtenidas a partir de estas materias primas de origen natural, son una alternativa para desarrollar nuevos materiales, respetando los parámetros de la química verde y sustentable.

El órgano más grande en la mayoría de los vertebrados es la piel. Esta, presenta una compleja estructura de tres capas, las cuales en condiciones normales tienen la capacidad de auto regeneración. La integridad de este órgano puede perderse debido a una injuria y producirse heridas extensas y profundas. Esto podría ocurrir por traumas agudos, heridas crónicas, intervenciones quirúrgicas y quemaduras.

Si bien la cicatrización de heridas es el proceso natural del cuerpo para la regeneración de daños y/o tejidos, la aplicación de un apósito apropiado en cuanto a su composición y con el agregado de un agente cicatrizante oportuno, puede ser capaz de mejorar el proceso de curación considerablemente, mediando en la etapa correcta y en la prestación de excelentes condiciones para la cicatrización.

Desde hace más de 60 años se ha demostrado que la heparina es útil en el tratamiento de las quemaduras, pues además de su propiedad anticoagulante tiene cualidades angiogénicas, antiinflamatorias, analgésicas y regenerativas del colágeno. Los primeros estudios, en perros, cerdos y ovejas, en los que se utilizó heparina de un modo experimental, demostraron que se obtenían mejores resultados en el tratamiento de las quemaduras, por lo que se amplió el uso a seres humanos. En el tratamiento de quemaduras de segundo y tercer grado con heparina en humanos, se observó mejoría notable del bienestar del paciente, permitió reducir el uso de analgésicos, se observó disminución de la frecuencia de infecciones y mejoría en el tiempo de reparación tisular.

El objetivo de este trabajo fue preparar apósitos, a partir de polímeros obtenidos de residuos costeros de nuestra zona, que resulten útiles para la curación de quemaduras dérmicas mediante el agregado de Heparina.

La quitina y el quitosano son polisacáridos que pueden obtenerse a partir de cáscaras de crustáceos y la gelatina de pescado es una proteína que puede obtenerse a partir de piel de merluza. Estos polímeros son ampliamente estudiados en la actualidad, para la elaboración de biomateriales para el cuidado de heridas y quemaduras, debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, capacidad de formar *films* y similitud a las moléculas que comprenden la matriz extracelular. El aprovechamiento de las cáscaras como materia prima en la obtención de estos biopolímeros aportaría una solución, ya que en nuestra zona, estos residuos costeros, constituyen un problema ecológico. En el Golfo San Jorge se desarrollan varias actividades económicas de relevancia, entre ellas dos pesquerías industriales: la pesquería de merluza común y la pesquería de langostino patagónico. Los residuos generados en la industria pesquera, luego de pelar los langostinos para comercializar su carne, son responsables de un gran problema ambiental en la provincia. Esto se debe a que la disposición final de estos restos, generalmente, es la propia playa, generando acumulación y problemas como el mal olor, el establecimiento de focos infecciosos, y el aumento poblacional de especies oportunistas, como las gaviotas e invasión de moscas.

De acuerdo al objetivo planteado, los resultados de esta tesis se presentan de la siguiente manera:

En el primer capítulo se resumen la definición, estructura, fuentes, métodos de obtención, así como aplicaciones de la quitina y el quitosano y los principales métodos de caracterización. Por otro lado, se describen los polímeros utilizados como entrecruzantes para mejorar las propiedades de los *films* preparados. Se describe una reseña de los problemas ecológicos generados por los residuos costeros y la manera de reutilizarlos para mejorar este inconveniente.

En el capítulo 2 se exponen los objetivos del trabajo.

En el capítulo 3, se describen los métodos utilizados a lo largo de todo el trabajo para la obtención y caracterización de polímeros y *films* en cada etapa.

En el capítulo 4 se detallan la obtención específica de quitina y quitosano con los rendimientos obtenidos y su caracterización a través de determinaciones como peso molecular, grado de desacetilación, entre otras. La preparación de *films* y la medición de propiedades de transporte y mecánicas de estos materiales poliméricos.

En el capítulo 5 se describen la síntesis y caracterización de soportes poliméricos de quitosano con otros polímeros naturales y semisintéticos. La caracterización y determinación de las propiedades de estos materiales. También el agregado de un agente antifúngico para evitar la contaminación de los *films*.

En el capítulo 6 se describen la preparación de *films* con quitosano de cáscara de langostino, gelatina de pescado y ácido tánico con agregado de aceites esenciales para aumentar su carácter biosustentable ya que se utilizan todos productos de origen natural. También se detallan la caracterización y medición de las propiedades de estos *films*.

En el capítulo 7 se detallan los estudios de carga y liberación controlada del agente cicatrizante elegido, Heparina, a partir de los *films* descriptos en el capítulo anterior.

Finalmente, en la última sección, se indican las conclusiones finales y las proyecciones para futuros trabajos.

## ***ABSTRACT***

Biopolymers are currently being studied in the field of tissue engineering and regenerative medicine to be used in the manufacture of dressings that contribute to the recovery of damaged tissues. Chitin and chitosan, as such, can be used to interact with biological systems fulfilling important functions in human health. The polymer matrices obtained from these raw materials of natural origin are an alternative to develop new materials, respecting the parameters of green and sustainable chemistry.

The largest organ in most vertebrates is the skin. This presents a complex structure of three layers, which under normal conditions can self-regenerate. But due to an injury, that integrity can be lost, and extensive and deep wounds can be produced. This could occur from acute trauma, chronic wounds, surgical interventions, and burns.

Although wound healing is the body's natural process for the regeneration of damage and/or tissues, the application of an appropriate dressing in terms of its composition and with the addition of a timely healing agent may be able to improve the healing process considerably by mediating at the right stage or providing excellent conditions for healing.

For more than 60 years, heparin has been shown to be useful in the treatment of burns, since in addition to its anticoagulant properties, it has angiogenic, anti-inflammatory, analgesic, and collagen regenerative qualities. The first studies, in dogs, pigs, and sheep, in which heparin was used experimentally, showed that better results were obtained in the treatment of burns, so its use was extended to humans to treat second and third-degree burns. Remarkable improvement in patient well-being, in tissue repair time, and reduction in the frequency of infections was observed by reducing the use of analgesics.

The objective of this work was to prepare dressings useful for healing dermal burns, by adding Heparin to polymers obtained from coastal waste in our area.

Chitin and chitosan are polysaccharides that can be obtained from crustacean shells. Fish gelatin is a protein that can be obtained from hake skin. These polymers are currently widely studied for the preparation of biomaterials for the care of wounds and burns, due to their biocompatibility, biodegradability, ability to form films and similarity to the molecules that comprise the extracellular matrix. The use of coastal waste as raw material to obtain these biopolymers was considered in this work, since in our area they constitute

an ecological problem. Several important economic activities take place in the Golfo San Jorge, including two industrial fisheries: the common hake fishery and the Patagonian shrimp fishery. The waste generated in the fishing industry, after shelling the prawns to market their meat, is responsible for a major environmental problem in the province. This is since the final disposal of these remains is generally the beach itself, generating accumulation and problems such as bad odor, the establishment of infectious sources, and the population increase of opportunistic species, such as seagulls as well as flies.

According to the stated objective, the results of this thesis are presented as follows:

The first chapter summarizes the definition, structure, sources, methods of obtaining as well as applications of chitin and chitosan and the main characterization methods. Also, the polymers used as crosslinkers to improve the properties of the prepared film are described. A review of the ecological problems generated by coastal waste and the way to upcycle those to solve this issue is described.

In chapter 2, the objectives of the work are explained.

In chapter 3, the methods used throughout this work to obtain and characterize polymers and films at each stage are described.

In chapter 4, details about the specific obtention of chitin and chitosan with the yields obtained and their characterization through determinations such as molecular weight, degree of deacetylation, are given. The preparation of *films* and the measurement of transport and mechanical properties of these polymeric materials are also addressed in this chapter.

In chapter 5, the synthesis and characterization of chitosan polymer supports with other natural and semisynthetic polymers is described. Including the characterization and determination of the properties of these materials, and the addition of an antifungal agent to avoid contamination of the *films*.

In chapter 6, the preparation of *films* with chitosan from shrimp shell, fish gelatin and tannic acid with the addition of essential oils to increase their bio sustainability, since all products of natural origin are used, is described. The characterization and measurement of the properties of these obtained materials are also detailed in this chapter.

In chapter 7, the loading and controlled release studies of the chosen healing agent, Heparin, from the previous obtained *films* is described.

Finally, in the last section, the conclusions reached and the prospects for future work are shown.

## **Abreviaturas**

APA.....	Ácido Poliacrílico
APG.....	Ácido Poly $\gamma$ -glutámico
APL.....	Ácido Poliláctico
APLG.....	Ácido g-poly (lactic-co-glycolic acid)
AT.....	Ácido Tánico
CA.....	Aceite Esencial del Canela
CL.....	Aceite Esencial de Clavo de Olor
FTIR.....	Espectroscopía Infrarroja-Transformada de Fourier
GA.....	Grado de Acetilación
GEA.....	Gelatina comercial Tipo A
GD.....	Grado de Desacetilación
Ge.....	Gelatina
Gen.....	Genipín
GEP.....	Gelatina de Pescado
HA.....	Ácido Hialurónico
HR.....	Humedad relativa
IR.....	Infrarrojo
IUPAC.....	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
Mv.....	Peso Molecular Promedio Viscosimétrico
Mw.....	Peso Molecular Promedio en Peso
NaOH.....	Hidróxido de Sodio
$\eta$ .....	Viscosidad Intrínseca
$\rho$ .....	Densidad
$\eta_{sp}/c$ .....	Viscosidad Reducida
Pa.....	Pascal
PCL.....	Policaprolactona
PET.....	Polietilentereftalato
PHA.....	Polihidroxialcanoatos
PM.....	Peso Molecular
PVA.....	Poliacetato de Vinilo

PVP.....	Polivinilpirrolidona
Qh.....	Quitosano
Qhc.....	Quitosano comercial
Qhl.....	Quitosano de langostino
Qi.....	Quitina
RMN.....	Resonancia Magnética Nuclear
Sor.....	Sorbitol
t.....	Toneladas
UV.....	Ultravioleta

## ***Índice de Tablas y Figuras***

### ***Capítulo 1 - Introducción***

<i>Figura 1.1</i> Clasificación de polímeros según diferentes criterios.....	28
<i>Figura 1.2</i> a) Polímero sintético b) polímero natural: celulosa c) polímero natural quitina.....	29
<i>Figura 1.3</i> Clasificación de Biopolímeros según su fuente .....	31
<i>Figura 1.4</i> Estructura química de la Qi.....	34
<i>Figura 1.5</i> Estructura química del Qh.....	35
<i>Figura 1.6</i> Mecanismo de reacción de la desacetilación de la Qi para obtener Qh	36
<i>Figura 1.7.</i> a) Adición nucleofílica del grupo hidroxilo .....	37
<i>Figura 1.7.b)</i> Eliminación del grupo amino.....	37
<i>Figura 1.7.c)</i> Equilibrio ácido – base entre el ácido carboxílico y la amina .....	37
<i>Figura 1.8</i> Estructura química de la gelatina.....	42
<i>Figura 1.9</i> Estructura química de la polivinilpirrolidona .....	43
<i>Figura 1.10</i> Estructura química del sorbitol .....	44
<i>Figura 1.11</i> Estructura química del genipín.....	44
<i>Figura 1.12</i> Estructura química del ácido tánico .....	45

### ***Capítulo 3 – Materiales y Métodos***

<i>Figura 3.1</i> Curva Esfuerzo ( $\sigma$ ) – Deformación ( $\epsilon$ ) .....	67
<i>Figura 3.2</i> Equipo para medición de la WVP de los <i>films</i> .....	71

### ***Capítulo 4 – Obtención de Quitina y Quitosano***

<i>Tabla 4.1</i> Condiciones exp en cada etapa de la obtención química de Qi	88
<i>Figura 4.1</i> Esquema del equipo empleado en la fermentación	89

<i>Tabla 4.2</i> Condiciones de la obtención de Qi por fermentación láctica	90
<i>Tabla 4.3</i> Masas de la materia prima utilizada para obtener Qi	94
<i>Tabla 4.4</i> Porcentajes de recuperación de Qi	94
<i>Figura 4.2</i> a) Fotografía de las cáscaras de langostino acondicionadas para la extracción b) Aspecto de la Qi obtenida por proceso de fermentación.....	95
<i>Tabla 4.5</i> Valores de obtención de Qi	97
<i>Figura 4.3</i> a) Fotografía de las cáscaras de langostino acondicionadas para la extracción. b) Aspecto de la Qi obtenida por proceso de fermentación	98
<i>Figura 4.4</i> Fotografía del quitosano obtenido a partir de cáscara de langostino por fermentación láctica .....	98
<i>Tabla 4.6</i> Masas obtenidas y Rendimientos de desacetilación	99
<i>Figura 4.5</i> Porcentajes de rendimientos gravimétricos de Qhl a partir de Qi con diferentes días de fermentación.....	99
<i>Figura 4.6</i> Espectros FTIR de la Qi y Qhl extraído por fermentación láctica.....	102
<i>Tabla 4.7</i> Valores obtenidos de Peso Molecular Viscosimétrico (Mv) del Qhl....	103
<i>Figura 4.7</i> Gráfico de $\eta_{sp}/c$ en función de la concentración (g/mL).....	104
<i>Tabla 4.8</i> Parámetros del Mv del Qhl.....	104
<i>Figura 4.8</i> a) Curvas de titulación del quitosano comercial y obtenido de langostino b) Curva de la primera derivada .....	105
<i>Figura 4.9</i> Film de quitosano obtenido a partir de cáscara de langostino .....	106
<i>Figura 4.10</i> Espectro FTIR de los films preparados .....	107
<i>Figura 4.11</i> Índice de Hinchamiento (%) de films de Qhc y Qhl a diferentes pH.	108

## **Capítulo 5 - Síntesis y caracterización de soportes poliméricos de quitosano con otros polímeros naturales y semisintéticos**

<i>Figura 5.1</i> Films preparados de a) Qhc-GEA-Ce <sup>+3</sup> , b) Qhl, c) Qhl-GEA-Ce <sup>+3</sup> y d) GEA.....	118
<i>Figura 5.2</i> FTIR de films GEA, Qhl, Qhc, Qhl-GEA-Ce <sup>+3</sup> y Qhc-GEA-Ce <sup>+3</sup> .....	120

<i>Figura 5.3</i> Reacción postulada para la interacción entre Qh y GEA.....	120
<i>Figura 5.4</i> FTIR de <i>films</i> Qhc-GEA-PVP-Ce <sup>+3</sup> y Qhl-GEA-PVP-Ce <sup>+3</sup> .....	122
<i>Figura 5.5</i> Esquema de la red formada entre quitosano y PVP .....	123
<i>Figura 5.6</i> FTIR de <i>films</i> Qhc-GEA-Ce <sup>+3</sup> , Qhc-GEA-Sor-Ce <sup>+3</sup> y Qhl-GEA-Sor-Ce <sup>+3</sup> .....	124
<i>Figura 5.7</i> Interacción entre el quitosano y el sorbitol como plastificante.....	124
<i>Figura 5.8</i> FTIR de <i>films</i> Qhc-GEA-Gen-Ce <sup>+3</sup> y Qhl-GEA-Gen-Ce <sup>+3</sup> .....	126
<i>Figura 5.9</i> a) Interacción entre quitosano y genipín b) Redes tridimensionales al combinar quitosano con gelatina y genipín.....	127
<i>Figura 5.10</i> FTIR de <i>films</i> Qhc-GEA-Ce <sup>+3</sup> con diferentes concentraciones de Gen agregadas. a) 10 % de Gen, b) 15 % de Gen y c) 20% de Gen .....	128
<i>Tabla 5.1</i> Valores de WVP y WVTR.....	129
<i>Tabla 5.2</i> Valores de WVP y WVTR de <i>films</i> entrecruzados .....	129
<i>Figura 5.11</i> Valores de IH en el equilibrio a) Qhl-GEA-Ce <sup>+3</sup> a pH 7 b) Qhc-GEA- Ce <sup>+3</sup> a pH 7 c) Qhl-GEA-Ce <sup>+3</sup> a pH 4 d) Qhc-GEA-Ce <sup>+3</sup> a pH 4.....	131
<i>Figura 5.12</i> Valores de IH en el equilibrio a) Qhl-GEA-PVP-Ce <sup>+3</sup> a pH 4 b) Qhl- GEA-PVP-Ce <sup>+3</sup> a pH 7 c) Qhl-GEA-Sor-Ce <sup>+3</sup> a pH 4 d) Qhl-GEA-Sor-Ce <sup>+3</sup> a pH 7 e) Qhl-GEA-Gen-Ce <sup>+3</sup> a pH 4 f) Qhl-GEA-Gen-Ce <sup>+3</sup> a pH 7.....	133
<i>Figura 5.13</i> IH de todos los <i>films</i> a ambos pH .....	134

## Capítulo 6 - Síntesis de Biopolímeros

<i>Figura 6.1</i> Esquema de la secuencia aminoacídica típica de la gelatina .....	144
<i>Figura 6.2</i> Esquema de la extracción de gelatina de pescado a partir de piel de merluza.....	147
<i>Figura 6.3</i> Aparato de electroforesis en gel.....	148
<i>Tabla 6.1</i> Condiciones experimentales en la preparación de <i>films</i> Qhc-GEA y Qhl- GP.....	149
<i>Tabla 6.2</i> Condiciones experimentales en la preparación de <i>films</i> Qhc-GEA-Gen- Ce <sup>+3</sup> y Qhl-GP-Gen-Ce <sup>+3</sup> .....	150

<i>Tabla 6.3</i> Condiciones de preparación de <i>films</i> con ácido tánico y $Ce^{+3}$ .....	152
<i>Figura 6.4</i> Procedimiento de formación de <i>films</i> de Qhc y GEA con AT oxidado y sin oxidar .....	152
<i>Tabla 6.4</i> Condiciones de preparación de <i>films</i> con aceites esenciales .....	154
<i>Figura 6.5</i> Fotografía de la piel de merluza y GP deshidratada .....	155
<i>Figura 6.6</i> Espectro FTIR de GP y GEA .....	157
<i>Figura 6.7</i> Perfil electroforético (SDS-PAGE) de GP .....	158
<i>Figura 6.8</i> Determinación del pI de la GP .....	159
<i>Figura 6.9</i> Fotografía del <i>film</i> preparado de Qhl-GP- $Ce^{+3}$ .....	160
<i>Figura 6.10</i> Fotografía del sistema para oxidar el AT .....	161
<i>Figura 6.11</i> Esquema de reacción de reticulación entre AT y gelatina .....	162
<i>Figura 6.12</i> Espectro FTIR del <i>film</i> GP-Qhl- $Ce^{+3}$ .....	164
<i>Figura 6.13</i> Espectro FTIR Qhl-GP-Gen- $Ce^{+3}$ .....	165
<i>Figura 6.14</i> Espectro FTIR Qhl-AT- $Ce^{+3}$ y Qhc-AT- $Ce^{+3}$ .....	166
<i>Figura 6.15</i> Espectro FTIR GEA-ATox- $Ce^{+3}$ y GP-ATox- $Ce^{+3}$ .....	168
<i>Figura 6.16</i> Espectro FTIR GEA-ATox y GEA-ATox-CL .....	169
<i>Figura 6.17</i> Espectro FTIR Qhc-AT-CA y Qhc-AT-CL .....	170
<i>Figura 6.18</i> Formación de base de Schiff entre quitosano y cinamaldehído .....	171
<i>Tabla 6.5</i> Valores de WVP y WVTR de todos los <i>films</i> preparados .....	172
<i>Tabla 6.6</i> Valores de IH de todos los <i>films</i> a diferentes valores de pH .....	175
<i>Figura 6.19</i> Valores de IH de todos los <i>films</i> a diferentes valores de pH .....	177
<i>Figura 6.20</i> Valores de IH Qhc-GEA- $Ce^{+3}$ pH 4 .....	178
<i>Figura 6.21</i> Valores de IH variando la concentración de AT .....	179
<i>Figura 6.22</i> Curvas Esfuerzo-Deformación .....	180
<i>Figura 6.23</i> Valores de Tensión a la rotura TS (N) para cada <i>film</i> .....	181
<i>Figura 6.24</i> Porcentaje de elongación (% EB) para de cada <i>film</i> .....	181
<i>Figura 6.25</i> Curva Esfuerzo-Deformación con distintos % de Gli agregados .....	182

*Figura 6.2* Actividad antimicrobiana de los *films* probados..... 184

***Capítulo 7 – Estudios de aplicación. Carga y liberación controlada de heparina a partir de films de quitosano***

*Figura 7.1* Estructura de un corte de piel..... 196

*Tabla 7.1* Lista de las características de cada tipo de quemadura..... 199

*Figura 7.2* Estructura química de la Hep ..... 202

*Figura 7.3* Espectros FTIR Qhc-AT-Ce<sup>+3</sup>, Qhc-AT-Ce<sup>+3</sup>-Hep y Hep..... 208

*Figura 7.4* Espectros FTIR Qhc-AT-Ce<sup>+3</sup>-Hep y Qhl-AT-Ce<sup>+3</sup>-Hep ..... 210

*Figura 7.5* Hep liberada de los *films* a diferentes tiempos y temperaturas ..... 211

## ***DESARROLLO DE LA TESIS***

## Capítulo 1 – Introducción

### 1.1 Objetivo

Introducir al lector en la historia de los polímeros y describir las generalidades de las moléculas utilizadas en estas tesis, tales como quitina, quitosano y gelatina.

### 1.2 Generalidades de la Ciencia de los Polímeros

#### 1.2.1 Historia de los Polímeros

Los materiales poliméricos tienen una presencia en la vida cotidiana cada vez más evidente, esto ha llevado a que, en los últimos años, grupos de investigación de distintas universidades se interesen en su estudio y desarrollo. (Young. R. 2011) El paso inicial en la síntesis de materiales poliméricos data de 1869 y fué la obtención del celuloide a partir de la celulosa. (Avila. A. 2010).

Según la IUPAC, un polímero es una macromolécula, es decir, una molécula con masa molecular elevada, formada esencialmente por la repetición múltiple de unidades derivadas de otras moléculas de masa molecular más pequeña denominadas monómeros (IUPAC Compendium of Chemical Terminology. The Gold Book edición online. <http://goldbook.iupac.org/>. 2013) Los monómeros constituyen la unidad estructural básica de un polímero. Las uniones entre los átomos que constituyen la columna vertebral de la cadena polimérica generalmente son covalentes. Su nombre deriva del griego “*poli*”, que significa muchos y “*meros*” que significa partes. (Etimología y origen de algunos términos científicos. Universidad de Valencia <http://www.uv.es/~jaguilar/historias/etimol.html>. 2013) Los polímeros se clasifican según diferentes criterios, como su origen, comportamiento térmico, mecanismo de polimerización y estructura. (*Figura 1.1*) (Ghosh. P. 2001).

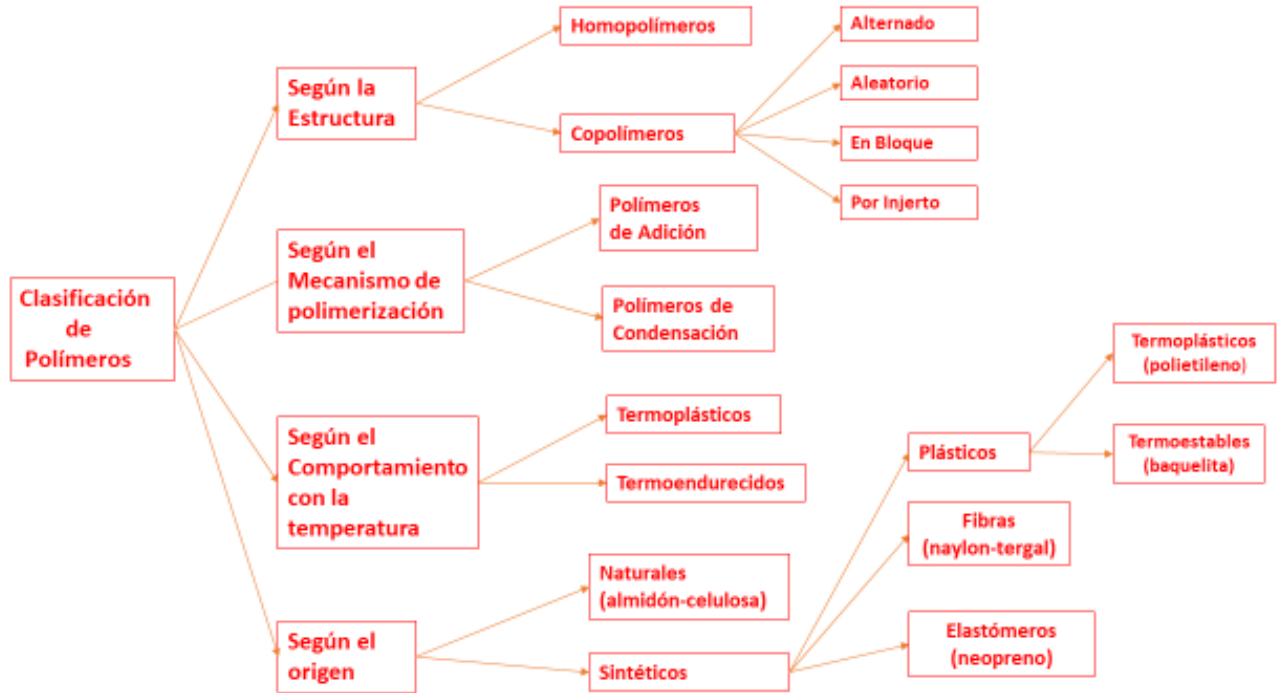


Figura 1.1 Clasificación de polímeros según diferentes criterios

(Adaptación de Billmeyer. F. 2020)

## 1.2.2 Polímeros naturales y sintéticos

De acuerdo a su origen, los polímeros se clasifican en naturales y sintéticos (plásticos). En la *Figura 1.2 a, b y c*, se muestran ejemplos de cada uno. Los polímeros sintéticos pueden ser tanto orgánicos como inorgánicos y, son los que se obtienen por síntesis ya sea en industrias o en laboratorios. En su mayoría derivan del petróleo (Vroman. I, Tighzert. L. 2009). En este grupo se encuentran, los cauchos sintéticos y las fibras artificiales, entre otros. Los polímeros naturales, por su lado, son aquellos que provienen de los seres vivos. Se clasifican en tres grandes grupos: polisacáridos, proteínas y polinucleótidos. Estos cumplen funciones vitales en los organismos vivos y por lo tanto se los denomina biopolímeros (López Serrano. F, Mendizábal. E. 2015). Otros son la seda, algodón, madera y quitina (Qi). Los polímeros semisintéticos son aquellos que resultan de la modificación de un polímero natural, como la nitrocelulosa o el caucho vulcanizado.



Figura 1.2 a) Plásticos b) polímero natural: celulosa c) polímero natural quitina

(Adaptación de Ávila. A. 2010)

### 1.3 Biopolímeros

La preocupación de la comunidad científica mundial por reducir la actual dependencia de los combustibles fósiles y así generar un verdadero impacto ambiental positivo, llevó a la búsqueda de nuevos biocompuestos o polímeros semi-sintéticos. (Paladines Salcedo. X. 2016) Particularmente, los polímeros de origen natural, tales como almidón, colágeno, gelatina (Ge), alginato, celulosa, quitina (Qi) y quitosano (Qh), ácido poli láctico (PLA), polihidroxicanoatos (PHA), representan candidatos atractivos dentro de los biopolímeros. Su utilidad es muy amplia abarcando campos como el industrial, farmacéutico, biomédico entre los principales. Dentro de las ventajas del uso de polímeros naturales se puede mencionar su alta disponibilidad, higroscopicidad, biocompatibilidad, biodegradación, diversidad de interacciones biológicas y la presencia de grupos reactivos polares que funcionalizan la molécula. Sus desventajas radican en las pobres propiedades mecánicas y la posible pérdida de las propiedades biológicas durante el proceso de formulación. Por otro lado son frágiles, y de bajas resistencias térmica y a la humedad. (Thakur. V. et al. 2014) Habitualmente, se utilizan en forma de materiales compuestos en los que la asociación de dos o más sustancias con características propias forma un nuevo material, cuyas propiedades son superiores a la de cada uno de sus componentes. Esto es de gran interés en diversas áreas tecnológicas ya que en ellos se busca combinar las ventajas de ambos constituyentes, pudiendo diseñarse materiales con propiedades y usos novedosos e interesantes. Para obtener materiales altamente biocompatibles y funcionales, se emplean metodologías de modificación de superficie, reacciones de entrecruzamiento, inclusión de agentes plastificantes, entre otras alternativas. (MacNeil. S. 2008)

De este modo, se puede diseñar biomateriales con propiedades superadoras. El término biomaterial designa a aquellos materiales de origen natural o sintético utilizados en la fabricación de dispositivos que interactúan con sistemas biológicos y que se aplican en diversas ramas de la salud humana, como regeneración o sustitución de tejidos, órganos o funciones del cuerpo. (Tian. H. et al. 2012) En esta definición están comprendidos materiales muy diferentes tales como los metales, los cerámicos y los polímeros, tanto naturales como sintéticos.

### **1.3.1 Clasificación de biopolímeros según método de obtención**

- Biopolímeros a partir de recursos renovables: son sintetizados naturalmente por plantas y/o animales, o bien sintetizados artificialmente a partir de recursos renovables.
- Biopolímeros a base de petróleo: se sintetizan a partir del petróleo, pero son biodegradables al final de su vida útil.
- Biopolímeros a partir de fuentes mixtas: surgen de la combinación de materiales de base biológica y monómeros derivados del petróleo.

En la *Figura 1.3* se muestra la clasificación de los biopolímeros. (Rodríguez. S, Orrego A. 2016)

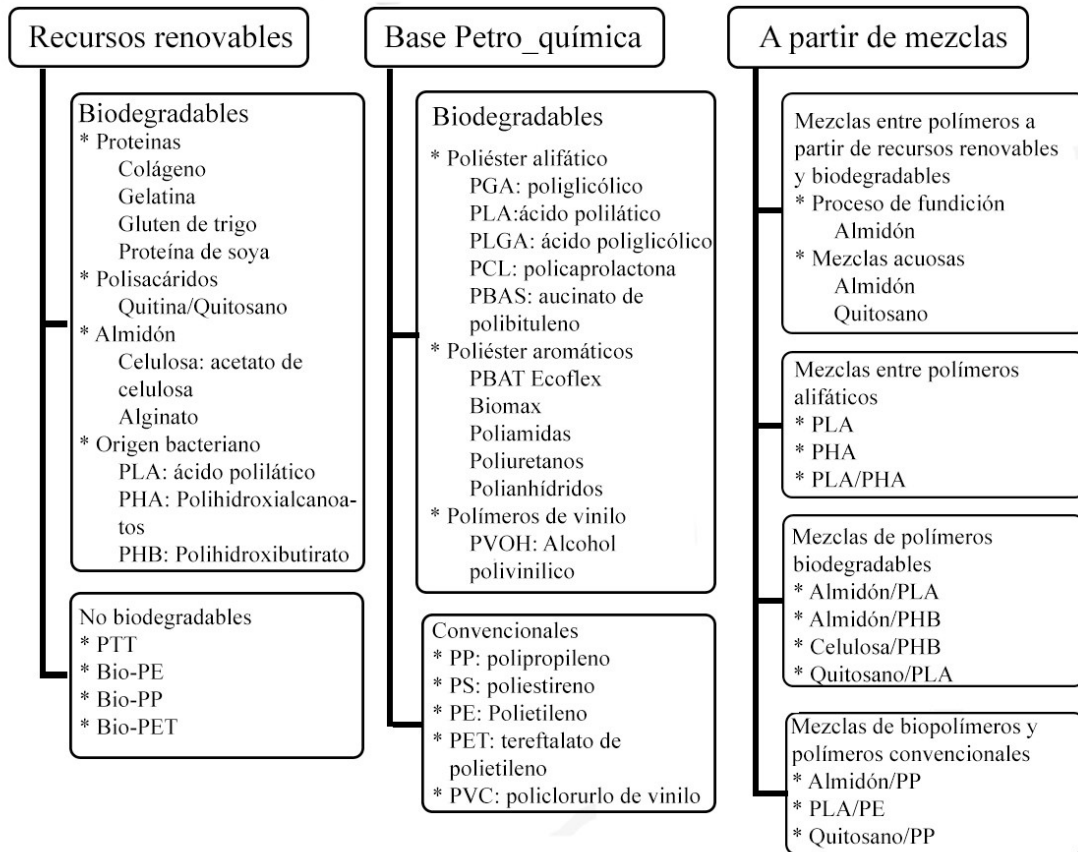


Figura 1.3 Clasificación de Biopolímeros según su fuente

(Rodríguez. L, Orrego. C. 2016)

Los biopolímeros de origen microbiano y en especial los PHA y PLA están alcanzando gran importancia en la industria y particularmente en la salud, debido a su carácter biodegradable y biocompatible. Han sido objeto de estudio en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas, por ejemplo, para mejorar el suministro y dosificación de medicamentos, para el desarrollo de nuevos dispositivos médicos. (Salazar. et al. 2015) Los PHA son biopolímeros completamente biodegradables, sintetizados y catabolizados por una amplia gama de microorganismos (bacterias y hongos) y por algunas plantas. Los microorganismos los acumulan como reserva de carbono y energía, en forma de gránulos intra-citoplasmáticos y están constituidos por unidades repetitivas de diversos hidroxiacidos o mezclas de ellos, producidos mediante fermentación de materias primas renovables. (Gómez Cardozo. J. 2013) Son así producidos directamente mediante fermentación de una fuente de carbono por parte del microorganismo. En cuanto a su utilidad son sustitutos atractivos de los poliésteres de origen petroquímico, dado que en la naturaleza, los microorganismos son capaces de degradarlos hasta CO<sub>2</sub> y agua, en

condiciones aerobias, y hasta metano, en condiciones anaerobias, por acción de las enzimas PHA despolimerasas y PHA hidrolasas. (Kirchhof. S. et al. 2015) También se emplean como recubrimientos en la elaboración de dispositivos de liberación controlada de fármacos. (Mutlu. H et al. 2010)

El PLA es un polímero sintético termoplástico de la familia de los alfa-hidroxiácidos o poliésteres alifáticos derivado 100% de materias primas renovables, que se producen a partir del ácido láctico. (Gomes. M. et al. 2013)

La mezcla de biopolímeros y polímeros sintéticos proporciona materiales con mejores propiedades, ya que se puede aumentar la biocompatibilidad y la biodegradabilidad, y optimizar las propiedades térmicas y mecánicas, con importantes reducciones de costos. (Ardila. L. et al. 2011) Tales mezclas pueden ser utilizadas en industrias como la automotriz, construcción, eléctrica/electrónica, biomédica, empaques, entre otras. (Sionkowska. A. 2011)

La industria biomédica es la principal demandante de estos materiales llamados también bioartificiales/biosintéticos o materiales híbridos. (Alcântara. A. et al. 2016)

## **1.4 Quitina y Quitosano**

### **1.4.1 Origen y propiedades de la quitina**

La quitina (Qi) es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. Su nombre deriva de un vocablo griego que significa “túnica” o “envoltura”, haciendo referencia a su dureza. Es producida por una variedad de animales, siendo el componente estructural del exoesqueleto de insectos, crustáceos, artrópodos y de la pared celular de algunos hongos. (Rinaudo. M. 2006) Particularmente, en los crustáceos, es un componente orgánico que conforma una estructura de sostén organizada, agrupada con complejos de proteínas, minerales y lípidos. Aunque estos organismos marinos son de vida corta, producen una gran cantidad de biomasa. (Goycoolea. F. et al. 2000) Químicamente, la Qi posee una estructura similar a la celulosa, con la diferencia de que el hidroxilo del C2 de cada glucosa está sustituido por un grupo acetamido. Es un polisacárido lineal que contiene cadenas  $\beta$ -(1-4)-2-acetamido-2-desoxi-1-glucopiranosas.

Se extrae industrialmente mediante procesos químicos sucesivos de desproteínización en medio alcalino. (Mármol. Z et al. 2004) El monómero que conforma la Qi se llama quilobiosa. (Figura 1.4) La quilobiosa fue aislada por primera vez en 1822 por Braconnot, a partir de hongos superiores dándole el nombre de “fungina”, su análisis químico arrojó que se trataba de una mezcla de Qi y poliglucano no nitrogenado. Más tarde, en 1823 Odir, la aisló como uno de los componentes de los élitros de insectos en solución alcalina insoluble. (Berghoff. C. 2011) En 1823, Children presenta resultados de sus estudios de Qi y resalta la presencia de nitrógeno en su composición elemental. En 1876, la Qi de artrópodos, fue sometida a hidrólisis con ácido clorhídrico obteniéndose un amino azúcar y ácido acético como productos de degradación. El azúcar fue llamado glucosamina y se sugirió que la Qi era un compuesto de este azúcar con ácido acético. (Lárez Velázquez. C. 2006) En la naturaleza se han detectado tres formas polimorfas de Qi, llamadas:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -Qi, la diferencia entre ellas se encuentra en la disposición de las cadenas poliméricas. La  $\alpha$ -Qi se presenta en disposición tal que permite la mayor cantidad de formación de uniones puente hidrógenos intermoleculares, que son los responsables de su insolubilidad en disolventes acuosos y en la mayoría de solventes orgánicos. (Tello Palma. E. 2017) Comparando la abundancia natural de las formas polimorfas, la  $\alpha$ -Qi es la más abundante y estable, mientras que las otras dos se presentan en pequeñas cantidades y tienen la tendencia a ser transformadas en  $\alpha$ -Qi. (Valenzuela Chamorro. C. 2006) La principal fuente industrial de Qi procede del tratamiento de caparazones de crustáceos en condiciones ácidas para eliminar el carbonato de calcio, componente mayoritario, seguido de un tratamiento alcalino para extraer el componente proteico. (Goycoolea. F. et al. 2000) Se suele finalizar el proceso con una decoloración mediante la extracción de pigmentos con solvente o la oxidación de los mismos, y las condiciones empleadas se deben adaptar según la fuente de quitina. (Rinaudo. M. 2006) La Qi así obtenida es una sustancia muy clara, blanquizca o amarillenta, y se puede presentar tanto en polvo como en escamas. Se la puede procesar para obtener derivados, de los cuales el más conocido y de mayor aplicación es el Qh.

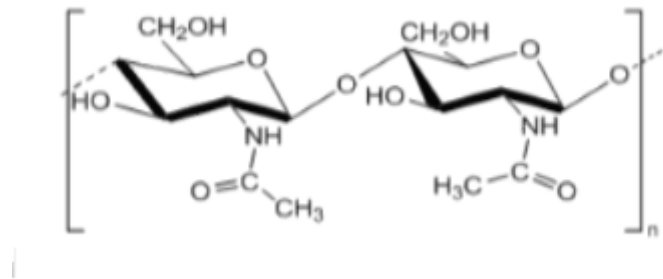


Figura 1.4 Estructura química de la Qi

### 1.4.2 Origen, propiedades y usos del quitosano

El quitosano (Qh), es un polisacárido obtenido por la desacetilación de la Qi, formado mayoritariamente por unidades de 2-amino-2-desoxi-1-glucopiranosas. (Nair. L. et al. 2007) (Figura 1.5) A partir de este biopolímero se pueden obtener numerosos derivados como hidrogeles, *films*, micro y nano partículas, que tienen aplicaciones en diferentes campos como la biología, bioquímica, medicina, farmacología, industria química de pinturas, fertilizante, entre otras. (Mayet. N. et al. 2014) Este polímero presenta diferentes alomorfos que dependen del modo de obtención del mismo, así como de su grado de acetilación y de polimerización. (Parada. L. et al. 2004) Presenta carácter hidrófilo (por la presencia del grupo amino NH<sub>2</sub>) e hidrófobo (por la presencia del grupo acil amino) esto hace que varíen sus propiedades según la proporción de unidades acetiladas y desacetiladas que lo conformen. La fuente de Qi y los incontrolados procesos de desacetilación son los principales factores que afectan las propiedades finales del Qh. (Hidalgo. C. et al. 2009) La masa molar (MM) varía de 50 a 2000 KDa. El porcentaje de desacetilación (%D) indica la carga catiónica de la molécula después de la disolución en ácido y, varía del 60 al 100 %, dependiendo de las condiciones de reacción usadas. La desacetilación completa difícilmente se logra y normalmente no es necesaria ya que la solubilidad en solución de ácido diluido se logra a partir de un 60% D. Particularmente, el empleo de Qh como biomaterial, se debe a sus conocidas ventajas de biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad y capacidad antibacteriana. (Abrusci. C. et al. 2012) Las alomorfos hidratada y anhídrida del Qh, han sido las más estudiadas. (Domard. A. et al. 1989) No obstante aún con todas sus propiedades, la aplicación particularmente en ingeniería de tejido, ha sido restringida por su inherente estabilidad al

agua, su pobre estabilidad térmica y propiedades mecánicas relativamente débiles, especialmente en ambientes húmedos. (Valencia-Gómez. L. et al. 2016) La modificación química abre numerosos caminos a una gran diversidad de usos.

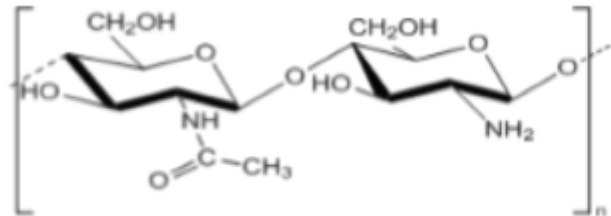


Figura 1.5 Estructura química del Qh

Otras áreas de aplicación del Qh son la agricultura y operaciones post-cosecha, en el tratamiento de aguas residuales, la industria cosmética, la industria alimenticia, por mencionar las principales. Entre las aplicaciones más comunes en la agricultura se encuentran los sistemas de liberación de fertilizantes, como agente bactericida y fungicida y en el recubrimiento de semillas con películas de Qh para su conservación durante el almacenamiento. (Lárez Velázquez. C. 2006) Por otro lado, en el área medicinal, se emplean para la producción de suturas quirúrgicas, producción de gasas y cremas bactericidas para el tratamiento de quemaduras, inmovilización de enzimas y células, para la separación de proteínas y recuperación celular. En el tratamiento de efluentes, se utiliza como coagulante primario para aguas residuales de alta turbidez y alcalinidad como floculante para la remoción de partículas sólidas y para la captura de metales pesados y pesticidas en soluciones acuosas. En la industria cosmética se los utiliza en la fabricación de cápsulas para adelgazar, como aditivo bactericida en jabones, champús, cremas de afeitar, entre otras. Así mismo, en la industria alimenticia se aplican en la eliminación de colorantes, como exaltador del sabor, antioxidante, emulsionante y aditivo de alimentos para animales. (Covas. C. 2006)

### 1.4.3 Obtención de quitosano a partir de quitina

Para obtener Qh, la Qi debe ser desacetilada con NaOH. En esta reacción ocurre una hidrólisis en la que el ión hidróxido, fuertemente nucleófilo, ataca inicialmente a los grupos acetamida presentes en el C<sub>2</sub> mediante un mecanismo de adición–eliminación nucleofílica, para generar Qh. (Figura 1.6)

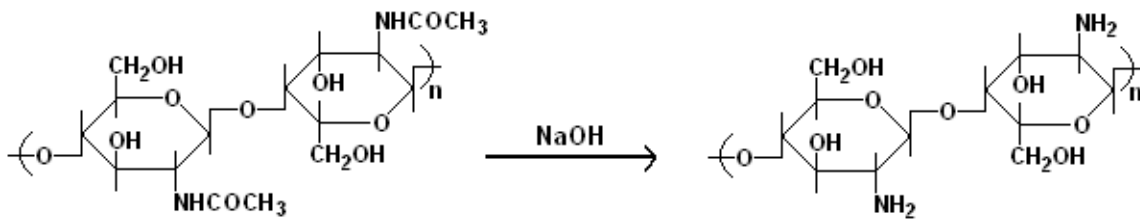


Figura 1.6 Mecanismo de reacción de la desacetilación de la Qi para obtener Qh

El mecanismo de reacción de desacetilación consiste en tres etapas, el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo en la posición electrófila del grupo carbonilo de la Qi con formación de un intermediario tetraédrico, la eliminación del grupo amino (NH-R) del intermediario tetraédrico para la formación del ácido carboxílico correspondiente y por último, la deprotonación del ácido por parte de la amina (glucosamina), que se comporta como base. Este equilibrio es muy favorable y desplaza los anteriores equilibrios hacia el producto final. (Figura 1.7 a, b y c) Esta reacción ocurre en un medio fuertemente alcalino a altas temperaturas, debido a la combinación de factores tales como, la baja reactividad debida a la configuración trans de los sustituyentes acetamida, con respecto al grupo -OH, unido al átomo de C<sub>3</sub> del anillo piranósico de la unidad monomérica; la presencia de uniones puente hidrógeno entre los grupos hidroxilo, carbonilo y amida de cadenas adyacentes y por último al denso empaquetamiento de las cadenas en el enrejado cristalino de la Qi, que previene el acceso del álcali a los sitios reactivos.

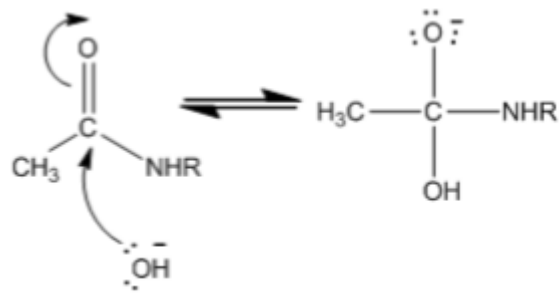


Figura 1.7. a) Adición nucleofílica del grupo hidroxilo

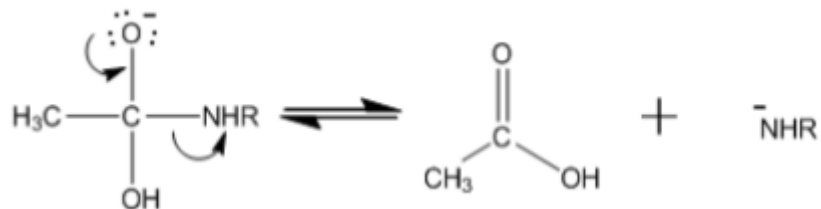


Figura 1.7.b) Eliminación del grupo amino

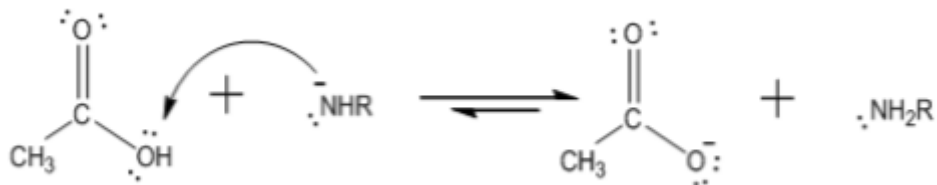


Figura 1.7.c) Equilibrio ácido – base entre el ácido carboxílico y la amina

## 1.5 Aplicaciones biomédicas

### 1.5.1 Antecedentes del uso de polímeros en biomedicina

En los últimos años, una revolución en ingeniería de tejidos, medicina regenerativa, terapia génica y liberación controlada de fármacos promovieron la necesidad de preparar

biomateriales con nuevas propiedades y control de su biodegradabilidad. La tendencia actual, predice que, en los próximos años, muchos de los soportes permanentes utilizados para aplicaciones terapéuticas temporarias, sean sustituidos por soportes biodegradables que puedan ayudar al cuerpo a reparar y regenerar los tejidos dañados. (Colorado Cañola. A. et al. 2013) El uso de materiales no biológicos en medicina se remonta al siglo XXX a. C, en el antiguo Egipto, tanto como en las civilizaciones clásicas de Grecia siglo VII a. C y Roma siglo IV d.C. En Europa, durante el siglo XVI se empleó el oro y la plata en intervenciones dentales. Los inconvenientes causados por las propiedades no adecuadas de estos metales relacionadas con la biocompatibilidad y la corrosión estimularon la investigación de nuevos materiales. La aplicación de biomateriales no metálicos comenzó durante la Edad Media, cuando fueron utilizados en ligaduras destinadas a detener hemorragias y en algunos procedimientos quirúrgicos. (Townsend. C. 2017) Sin embargo, la investigación sistemática y planificada de los materiales útiles para la fabricación de prótesis e implantes surge después de la segunda Guerra Mundial (1945) como consecuencia del avance del conocimiento en ciencia y tecnología de materiales. Un factor que impulsó el desarrollo de los materiales para implantes fue el enorme aumento de su demanda por la necesidad de rehabilitar a millones de inválidos de la guerra. Este aumento corrió en paralelo con avances en otros terrenos que crearon condiciones favorables para obtener soluciones muy eficaces, entre ellas cabe destacar la investigación y desarrollo de nuevos materiales, en especial los poliméricos. Durante las décadas del 40 y 50, la investigación y el desarrollo de los implantes estuvo exclusivamente en manos de cirujanos. Durante los 60 se publicaron los primeros estudios sobre las dificultades provocadas por la presencia de un implante, apareció el término biocompatibilidad para definir el grado de tolerancia del material por parte de la materia viva. (Pérez. J. 2014) La determinación de la biocompatibilidad para cada aplicación requiere la realización de una serie de ensayos de acuerdo con protocolos preestablecidos y del posterior análisis estadístico de los resultados obtenidos. El primer simposio de Biomateriales que se celebró en la Universidad de Clemson (Carolina del Sur, EE. UU), en 1969, marca el punto de partida de la necesaria integración de las disciplinas complementarias a la ingeniería y a la medicina para el desarrollo de materiales biomédicos. En 1978 se efectuó el primer Congreso Internacional sobre biomateriales, desde entonces se ha producido un crecimiento notable en el número de trabajos realizados y el nivel de los recursos humanos formados en el área. Sobre la duración y la forma del contacto que se establece con el organismo, los biomateriales suelen clasificarse como de uso temporal o

permanente y de localización intracorpórea o extracorpórea. Desde el punto de vista de su función se pueden distinguir entre ellos los dispositivos destinados al soporte de fármacos, al diagnóstico de una enfermedad, o al tratamiento de la misma. (Peppas. N. et al. 1994) Algunos biomateriales contienen fármacos y son considerados medicamentos, otros pueden incluir células vivas y constituir los llamados biomateriales activos. También hay biomateriales que incluyen compuestos capaces de responder a señales provenientes del medio biológico que reciben el nombre de materiales inteligentes. Los biomateriales tienen un campo de aplicación muy amplio que se extiende desde dispositivos de uso masivo y cotidiano como es el caso de jeringas, vendajes y catéteres, hasta sofisticados sistemas que se emplean para promover la regeneración de tejidos o para reemplazar órganos. (Usero. R. et al. 2010) La irrupción de los polímeros en la medicina es prometedora. La propia versatilidad intrínseca de estos materiales los convierte en los candidatos perfectos para abordar la gran cantidad de retos presentes en un sector tan exigente como el médico. En la revolución digital y las nuevas tecnologías productivas como la impresión 3D, los materiales poliméricos se presentan como uno de los ejes centrales. Todo ello, permite afirmar que la incorporación de los polímeros en el sector médico tendrá lugar en diversas formas y atacando diferentes frentes, en los que el material puede ser portador de fármacos, material estructural o el propio principio activo.

Particularmente, los sistemas en forma de películas (*films*) pueden ser empleados como apósitos con un amplio campo de aplicación. (Valencia-Gómez. L. et al. 2016) Estos potenciales apósitos de base polimérica, comparados con los tradicionales, permiten una óptima protección mecánica y buenas propiedades de barrera, con mínima adherencia a la herida y mejorando el proceso de cura del paciente. (Mogosanu. G. et al. 2014) Últimamente, han despertado especial interés los apósitos híbridos que combinan polímeros sintéticos y naturales. (Broussard. K. et al. 2013) Ejemplos de estos materiales, son los *films* semi-impermeables de nylon (PA) y poliuretanos con recubrimientos acrílicos o de Qh, con excelentes propiedades frente a heridas que requieren una correcta humectación. (Mayet. N. et al. 2014) De igual manera, las gasas activas capaces de absorber gran cantidad de líquido, son de gran interés para tratar quemaduras y otras heridas supurantes. (Mogosanu. G. et al. 2014) Los hidrocoloides poliméricos y derivados celulósicos por su parte, evitan la proliferación de microorganismos y aceleran el proceso de sanación, gracias a la liberación controlada de fármacos cicatrizantes o antisépticos. (Boateng. J. et al. 2008) Una ventaja asociada a los sistemas poliméricos en medicina es

su estructura orgánica, basada en carbono, de similitud con los sistemas biológicos mayor que los compuestos inorgánicos (Catauro. M. et al. 2015) Esta particularidad es de gran interés al buscar una interacción específica del polímero con el organismo vivo. Sin embargo, pueden existir una serie de problemas asociados a la presencia de restos de monómeros sin reaccionar. (Langer. R. et al. 2004) Otra dificultad que puede presentarse, son los procesos degradativos indeseados de la cadena polimérica o la presencia de aditivos con respuesta bioquímica. (Smith. M. et al. 1995)

### **1.5.2 Uso de quitosano en biomedicina combinado con distintos materiales**

El empleo de Qh como biomaterial, se debe a sus conocidas ventajas de biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad, capacidad antibacteriana y fungistática, estimulación de procesos de cicatrización, actividad hemostática, inmune y mucoadhesión. En particular, la actividad antimicrobiana del Qh está influenciada por varios factores como el tipo de quitosano, su grado de polimerización, el peso molecular, su viscosidad, el grado de desacetilación, la composición química y nutritiva del sustrato, y las condiciones ambientales, entre otros. (Rabea et al.2003) Las propiedades ya nombradas del Qh, además de la hemocompatibilidad, capacidad de estiramiento (compatibilidad con las propiedades mecánicas del tejido donde va a ser implantado) y la resiliencia (cantidad de carga absorbida después de la deformación elástica), hacen de este polímero, un importante material para el desarrollo de nuevos sistemas de aplicación biomédica. (Chen. Q. et al. 2013) Una propiedad más de los biopolímeros derivados de polisacáridos como el Qh es la capacidad de interacción con las células vivas. (Cascone. M. et al. 2001) En la práctica médica, tejidos e hilos fabricados a partir de este biopolímero son usados como pieles artificiales o en suturas. Hay numerosos trabajos que proponen el empleo del mismo como soporte para aplicaciones biomédicas, solo o combinado con otros biopolímeros. Sin embargo, los soportes basados en polímeros naturales presentan muchas limitaciones en cuanto a su procesamiento, debido a las malas propiedades mecánicas. (Zhang. Y. et al. 2013) Para superar estos inconvenientes surgen diferentes alternativas, como la combinación de polímeros naturales y sintéticos, el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas y la inclusión de agentes plastificantes. Otros polímeros muy usados en biomedicina, además de Qi y Qh, son colágeno, alginato, keratina, fibrina, ácido hialurónico, albúmina, almidón, celulosa y pectina (Mano. J. et al.

2007) El colágeno y el Qh han sido aplicados principalmente en piel, tejidos óseos, cartílagos, nervios, tendones y vasos sanguíneos. (Croisier. F. et al. 2013) Algunas alternativas, para mejorar las propiedades de transporte y mecánicas del Qh, que fueron utilizadas en este trabajo, incluyen la combinación con otros biopolímeros y polímeros sintéticos tales como polivinilpirrolidona (PVP), sorbitol (Sor), genipín (Gen), gelatina (Ge) y ácido tánico (AT).

### **1.5.2.1 Gelatina (GE)**

La GE es una proteína, derivada del colágeno de tejidos animales. El colágeno es una de las proteínas más abundantes en la naturaleza y es el responsable de mantener la integridad estructural de los tejidos. En la piel están presentes principalmente los tipos de colágeno sintetizados por los fibroblastos y los miofibroblastos. En la *Figura 1.8* se muestra su estructura química. La Ge posee buena biodegradabilidad y propiedades filmogénicas, sin embargo, forma *films* frágiles, muy hidrofílicos y fácilmente atacados por bacterias. (Yakimets. I. et al. 2005) La naturaleza altamente higroscópica de la Ge es su principal inconveniente, al considerar el uso de películas como barreras de protección, ya que tienden a hincharse o disolverse al entrar en contacto con superficies con alto contenido de humedad. (Bogí. A. et al. 2002) Para mejorar las propiedades de resistencia mecánica y al agua, la Ge puede combinarse con biopolímeros tales como el Qh. (Gómez-Guillén. M. et al. 2011) El uso de colágeno se expandió rápidamente por la industria farmacéutica y actualmente es usado como biomaterial para el desarrollo, en ingeniería de tejidos, de piel artificial, injertos de hueso, córneas, implantes de tendones, regeneración de nervios, piel y órganos; así también como en apósitos. (Sionkowska. A. 2011) Ha sido utilizado en el diseño de sustitutos de la piel y recientemente se ha utilizado para crear un modelo de endotelio de la dermis que promueve la reconstrucción espontánea de un capilar humano en forma de red. (Metcalf A. et al. 2007) Entre las formas en las que el colágeno es utilizado para aplicación en ingeniería de tejido de piel se encuentran geles de colágeno hidratados, colágeno bovino y colágeno enriquecido. (Colorado. A. et al. 2010) En la *Figura 1.8* se muestra la estructura química de la GE.

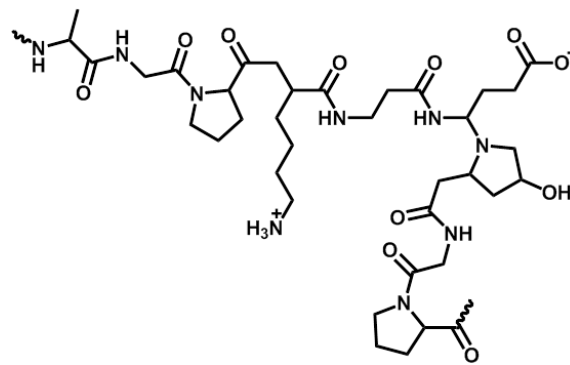


Figura 1.8 Estructura química de la GE

### 1.5.2. 2 Polivinilpirrolidona (PVP)

La Polivinilpirrolidona es un polímero sintético, que se obtuvo por primera vez en los años 30 a partir del monómero N-vinilpirrolidona. La *Figura 1.9* muestra su estructura química. Inicialmente fue utilizada como un expansor del plasma sanguíneo durante la segunda guerra mundial y más tarde, en una amplia variedad de aplicaciones en medicina, farmacia, cosmética y producción industrial. (Cabrera. J. et al. 2008) Entre sus características físicas, se puede mencionar que es soluble en agua y otros solventes polares. Químicamente es estable, no iónica y no tóxica. Una vez seca es un polvo escamoso claro, que absorbe fácilmente hasta un 40% de su peso en agua de la atmósfera y forma fácilmente *films*. La PVP se une a moléculas polares excepcionalmente bien, debido a las características de sus grupos funcionales. En estas propiedades radica el interés por su uso, siendo de primera elección en el diseño de biomateriales. (Gomez Tardajo. 2013) Actualmente, se utiliza en la preparación de hidrogeles. (Lakouraj. M. et al. 2005) Debido a su hidrofilia, no toxicidad y facilidad para formar complejos, estos hidrogeles se utilizan en medicina, en las industrias farmacéuticas y de alimentos. (Joshi. A. et al. 2006) Existen numerosos trabajos sobre hidrogeles de PVP, utilizando radiación gamma, buscando la obtención de materiales con potencial uso en la curación de heridas. (Cabrera. J. et al. 2008) Estos hidrogeles constituyen una clase de biomateriales poliméricos con un amplio campo de aplicación, en parte este éxito, está relacionado con algunas propiedades importantes que poseen, son blandos, elásticos e hidrofílicos pero insolubles en agua. (Kim. J. et al. 2008) Tienen la capacidad de absorber grandes cantidades de agua hinchándose y aumentando considerablemente su volumen sin perder

su forma hasta alcanzar un equilibrio de hinchamiento. (Richter. A. et al. 2008) Los hidrogeles se preparan entrecruzando las cadenas de polímeros hidrofílicos por métodos químicos o físicos. El tipo de grupos funcionales que presentan los polímeros utilizados, la concentración de estos en la mezcla, así como del método de entrecruzamiento utilizado, van a determinar sus propiedades y, por tanto, su aplicación potencial. (Haines. L. et al. 2005) Se han reportado trabajos en los que se prepararon *films* entrecruzados de Qh y PVP con aplicaciones biomédicas. (Martinelli. M, Aldana. A et al. 2011)

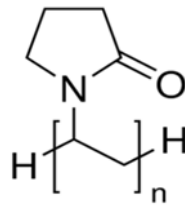


Figura 1.9 Estructura química de la PVP

### 1.5.2.3 Sorbitol (Sor)

El sorbitol es un polialcohol producido por la fotosíntesis en las hojas adultas de ciertas plantas de las familias *rosaceae* y *plantaginaceae*. Se encuentra en las hojas rojas y en frutos como peras, manzanas, cerezas y duraznos junto con la fructosa, la glucosa y la sacarosa. El Sor fue descubierto en 1872 por el francés Boussingault en las bayas de *Sorbus aucuparia* L. Comúnmente era llamado serbal de cazadores. Su fórmula empírica es  $C_6H_{14}O_6$ . (Figura 1.10) Es un sólido, higroscópico, utilizado en la industria como humectante, en la elaboración de alimentos, edulcorantes, fármacos y productos químicos, cosméticos, colas, emulsionantes, para mantener diversos productos con un grado de humedad apropiado. (Rotta. J, Ozório. R. et al. 2009) Es un buen agente entrecruzante que logra una miscibilidad deseada con el Qh por lo que se usa como plastificante, mejorando las propiedades de transparencia, solubilidad, estabilidad térmica y de superficie, así también como la humectabilidad. (Mei Liu. et al. 2013) En la Figura 1.10 se muestra la estructura química del Sor.

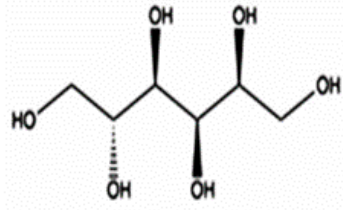


Figura 1.10 Estructura química del Sor

#### 1.5.2.4 Genipín (Gen)

El genipín es un compuesto iridoide, de origen natural, que se obtiene a partir del fruto de *genipa americana* y *gardenia jasminoides*. Estos frutos tienen propiedades antiinflamatorias, diuréticas, coleréticas y hemostáticas. Una propiedad destacable del Gen es su capacidad de reaccionar espontáneamente con aminas primarias, dando lugar a pigmentos azules. Se ha descrito su reacción con materiales que contienen grupos amino, como el Qh y algunos péptidos y proteínas, dando lugar a estructuras entrecruzadas químicamente. (Muzzarelli. R. 2009) Dicha propiedad permite su utilización como agente entrecruzante en sistemas de liberación de fármacos, como microcápsulas o hidrogeles. Al ser un agente de entrecruzamiento covalente las uniones formadas son fuertes y por esta razón es muy utilizado. Otra razón de la preferencia de su uso es debido a que presenta una toxicidad 5000-10000 veces más baja con respecto al glutaraldehído que es un entrecruzante de uso común. (Keskin. D. et al. 2005) La *Figura 1.11* muestra su estructura química.

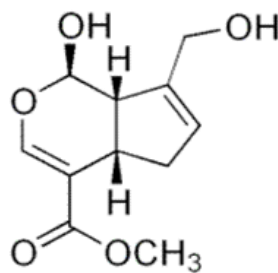


Figura 1.11 Estructura química del Gen

### 1.5.2.5 Ácido Tánico (AT)

El ácido tánico es un polifenol que se distribuye ampliamente como componente funcional importante de los tejidos vegetales. Se puede ver su estructura en la *Figura 1.12*. Está presente en raíces y frutos de diversas plantas. (Rivero. S. et al. 2010) Para obtener los polifenoles de los tejidos vegetales normalmente se utiliza una extracción acuosa o alcohólica, aunque últimamente está siendo ampliamente estudiada la extracción con fluidos supercríticos. Es reconocido por su capacidad antioxidante debida a sus múltiples grupos fenólicos que pueden interactuar con macromoléculas biológicas y por sus propiedades antimicrobianas. (Kim. T. et al. 2011) El AT es utilizado como entrecruzante de polímeros de origen natural. (Sahiner. N. et al. 2016)

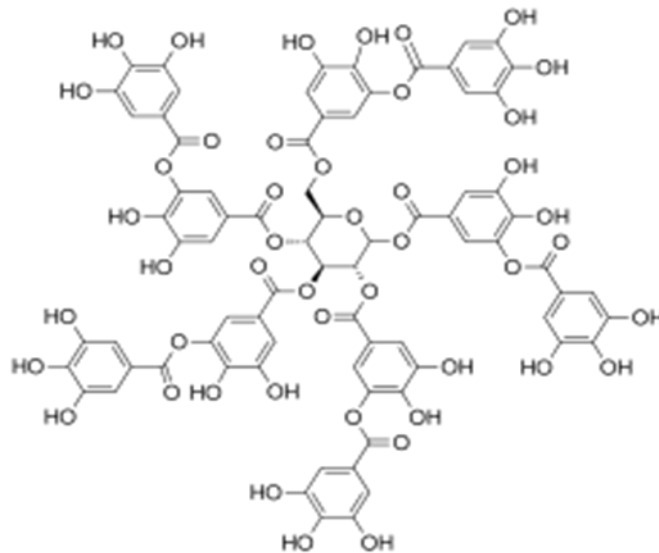


Figura 1.12 Estructura química del AT

### 1.5.3 Soportes biomédicos utilizados como apósitos

En algunas ocasiones puede ocurrir pérdida de la integridad de la piel debido a trastornos genéticos, traumas agudos, heridas crónicas, intervenciones quirúrgicas y quemaduras, las cuales representan las causas más comunes de pérdida de la piel, pudiendo resultar en heridas extensas y profundas. (Enoch. S. et al 2008) La cicatrización de heridas es un proceso biológico específico relacionado con el fenómeno general de crecimiento y

regeneración de los tejidos. A pesar de ser este un proceso natural del cuerpo para la regeneración de daños y/o tejidos, un apósito apropiado puede ser capaz de mejorar el proceso de curación considerablemente, mediando en la etapa correcta o en la prestación de excelentes condiciones para la cicatrización y/o haciendo de carriers de un fármaco adecuado. (Mandujano Tazza. N. 2020) Un apósito se puede definir como cualquier material empleado para cubrir, proteger y curar heridas de un tejido dañado. (Valencia-Gómez. L. et al. 2016) El apósito debe proteger la lesión y contribuir a la recuperación de los tejidos. Debe tener también un entorno húmedo en la interfase con la herida, permitir un intercambio gaseoso, actuar como una barrera para microorganismos y remover el exceso de exudado. Debería también ser no tóxico, no alergénico, no adherente y fácilmente removible, tener propiedades antimicrobianas y promover la cicatrización de la herida. Por otro lado, para la elaboración de un apósito útil, se busca un biomaterial fácilmente disponible que requiera un procesamiento mínimo. Los biopolímeros, en particular los polisacáridos y las proteínas son los más utilizados en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, para desarrollar materiales útiles en el cuidado de heridas y quemaduras debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, capacidad filmogénica y similitud a las moléculas que comprenden la matriz extracelular. (Valencia-Gómez. L. et al. 2016) En los últimos años, la comunidad científica ha trabajado intensamente en el estudio de las propiedades en las superficies de biomateriales destinados al uso biomédico, para mejorar sus cualidades tanto mecánicas como las referidas a la interacción entre ambas caras de contacto. La superficie de un biomaterial es de gran importancia debido a que es el primer punto de contacto con otros sistemas, como el cuerpo humano. Una interacción inadecuada entre los polímeros utilizados como soportes y las células, podrían conducir a reacciones indeseables, debido a que los materiales poliméricos se reconocen como cuerpos extraños. (Osorio-Delgado. M. et al. 2017) Se utilizan técnicas de modificación de superficie a fin de aumentar la funcionalidad de los materiales y la biocompatibilidad. (Coreño-Alonso. J. et al. 2010) En particular, en los apósitos con utilidad frente a quemaduras, cicatrización y recomposición de tejidos, liberación controlada de medicamentos, se deben ajustar las propiedades de los soportes obtenidos a partir de los polímeros empleados. Las propiedades de superficie requeridas en este campo son la hidrofiliencia, la lubricidad, la suavidad entre otras, las cuales determinan la biocompatibilidad con los tejidos y la sangre, además de influir en las propiedades físicas como durabilidad, permeabilidad y su capacidad de descomposición. (Pillai. O. et al. 2001) La degradabilidad puede ser ajustada para controlar la velocidad

de liberación de fármacos, que también depende del pH del medio, así como la naturaleza de la matriz. (Sahoo. S. et al. 2010) El Qh, PLA, poly ( $\gamma$ -glutamic acid) -g-poly (lactico-glycolic acid) (PGA y PLGA) son los más utilizados debido a sus propiedades y facilidad de procesamiento. (Jaimes Aguirre. L. 2016) Los compuestos de Qh/poliacetato de vinilo (PVA) se han investigado para el sistema de fármaco aspirina-heparina (Rogovina. S. et al. 2006) y Qh/Policaprolactona (PCL) para la administración de ofloxacina. (Sahoo. S. et al. 2010) Con propósitos semejantes se han usado asimismo mezclas de Qh con polímeros sintéticos. (Ahmed. T. et al. 2014) Otros ejemplos de uso de mezclas biopoliméricas para liberación de medicamentos son la combinación de ácido hialurónico (HA)/ácido poliacrílico (PAA) y de HA/PVA e hidrogeles/PVA para la administración de la hormona de crecimiento (Cascone. M. et al. 2001) y el alginato/PVA para la liberación oral de insulina. (Rodríguez-Sepúlveda. L. et al. 2016)

## 1.6 Desarrollo sustentable

El extraordinario desarrollo de los materiales poliméricos en ámbitos tan variados como el embalaje, el transporte, los equipamientos eléctricos y electrónicos, el mobiliario, la decoración, entre otros, explica las múltiples calidades y propiedades de estos materiales. Sin embargo, varias décadas de aplicación masiva para usos corrientes de la vida cotidiana han provocado la acumulación de “plásticos” en nuestro medio ambiente, generando fuentes de contaminación atmosférica y visual, además de suelos y medios marítimos. (Moreno Corrales. F. 2016) La toma de conciencia de esta contaminación a largo plazo (la vida de una “bolsa de plástico” abandonada en el suelo se estima en unos 200 años) y de los problemas de reciclaje de los plásticos ha estimulado el estudio sobre el uso de polímeros biodegradables. A la misma velocidad con que los plásticos se demandan, también se desechan. El consumo de plástico continúa creciendo. La producción mundial ha pasado de 2,3 millones de toneladas en 1950 a 407 millones en 2015 (Treat. J et al 2017) Un estudio estima que, de todo el plástico que el ser humano ha producido durante estos 150 años en todo el mundo, el 79%, está acumulado en vertederos o en entornos naturales. El mismo estudio refleja que actualmente el 57% del plástico producido mundialmente acaba abandonado. (Geyer. R. et al. 2017) Debido a su

baja densidad, algunos productos de plástico se dispersan fácilmente y, unido a su resistencia a la biodegradación, acaban contaminando la tierra y los océanos, amenazando a especies, sus hábitats e incluso nuestra salud. Con el paso del tiempo, estos plásticos abandonados en la naturaleza se fragmentan en porciones más pequeñas. (Zink. T. et al. 2018) Los microplásticos, con un tamaño menor a 5 mm, están plagando las costas y los fondos marinos. Se estima que en nuestros mares y océanos hay entre 5 y 50 billones de microplásticos. Por otro lado, muchos plásticos de un solo uso acaban formando parte de la naturaleza con un grave impacto ambiental. (Van Sebille. E. et al. 2015) Por todo lo antes expuesto y con el objetivo de contribuir a una solución a este problema medioambiental, la investigación en polímeros biodegradables está en pleno desarrollo. Nuevas alternativas basadas en polímeros naturales se han estudiado en los últimos años manteniendo las propiedades y la funcionalidad de los polímeros convencionales.

### **1.6.1 Biodegradación**

En los últimos años se han hecho varios intentos para definir de forma consensuada los términos degradación y biodegradación. Degradación es la ruptura física de un material, eventualmente por fragmentación, evidenciada por la pérdida de sus propiedades físico mecánicas. (Snair. L et al 2007) Se refiere a los procesos inducidos por luz solar, calor y otros agentes que conducen a una modificación de la estructura del polímero. La biodegradación, se trata de un proceso de degradación química llevado a cabo por agentes biológicos (enzimas, bacterias y microorganismos). En concreto, la biodegradación producto de la exposición ambiental implica la acción de microorganismos y tiene como consecuencia una reducción del grado de polimerización, así como la degradación del polímero en fragmentos orgánicos simples. La biodegradabilidad entre los polímeros es muy variada, por ejemplo, después de su uso, el polietilentereftalato (PET) tiene una vida útil de 125 años, y el PLA de 2 años. (Torres-Huerta. A. et al. 2014)

### 1.6.2 Residuos costeros de cáscaras de crustáceos

En Argentina se comercializa el langostino patagónico (*Pleoticus muelleri*), también conocido como langostino rojo argentino. La mayor densidad de esta especie se da justo frente a las costas de la Provincia del Chubut. Debido a que ésta es una de las mayores actividades económicas de la región resulta importante que la misma sea de manera responsable y en armonía con el medio ambiente y la población de las distintas localidades. Lo óptimo sería que los residuos de todos los subproductos de la actividad se transformen en un producto final que tenga utilidad. El exoesqueleto del langostino es desechado luego de extraer la carne para su comercialización. En nuestra provincia, por ejemplo, se utilizaban las cáscaras de langostino como ingrediente principal para generar harina de langostino o de pescado. Los costos de mantenimiento de esta industria generaron su cierre en los últimos años. De esta manera, el progresivo incremento en la generación de residuos ha afectado el equilibrio ecológico comenzando a dar las primeras señales de alarma. Hace algunos años se dio a conocer un notable crecimiento en la población de gaviotas cocineras (*Larus dominicanus*) en las ciudades costeras. Este aumento tiene un efecto directo sobre otros organismos como la ballena Franca Austral (*Eubalaena australis*) y numerosas especies de aves que coexisten geográficamente con la gaviota. Una de las teorías sobre la causa de este importante incremento poblacional apunta a su relación con los basurales a cielo abierto y, especialmente, con los desechos de pescado. Solo el puerto de Rawson genera, aproximadamente, 120 toneladas diarias de residuos de pescado. Por muchos años estos residuos no tenían otro fin que su abandono en basurales ubicados en los alrededores de la ciudad pesquera, generando problemas como el mal olor, el establecimiento de focos infecciosos, y el aumento poblacional de especies oportunistas, como las gaviotas. (Góngora. H. 2011) Sólo en la Provincia del Chubut se pescan más de 40.000 toneladas (t) de langostino por año, y para el año 2017 se alcanzó un máximo histórico sobrepasando las 50.000 t. A pesar de que una buena parte de este producto se vende entero, en la provincia se producen unas 5.000 t de desechos todos los años. En temporada de pesca de langostinos (mayo a agosto) se desechan entre 20 y 60 contenedores con residuos. (Gonzalez. P. et al. 2008) La Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación informó que el desembarco de crustáceos en las costas argentinas en el 2014 fue de alrededor de 130 mil t. El mayor porcentaje de captura corresponde al langostino, seguido por centolla y camarón. A estas

tres especies debe sumarse la incipiente captura de cangrejos por flotas artesanales que representan cerca de 2 t por mes. La cantidad de residuo sólido generado del procesamiento de estas especies depende en parte del rendimiento cárnico de cada crustáceo, siendo éste del 35-40% para langostinos y camarones y del 50-60% para el caso de cangrejos y centollas. Así, teniendo en cuenta los valores de captura anteriormente citados y, sumando un porcentaje estimativo de captura por asociaciones de pescadores artesanales, la cantidad de residuo sólido generado a lo largo de las costas del país asciende a 76 mil t por año. (Porta. F. et al. 2017) Por estas razones, es que el sector industrial tiene cada vez más interés por la reutilización de los residuos de cáscara de langostino estudiando que productos pueden extraerse de las mismas. Por un lado, se reduce la cantidad de residuos arrojada en los basurales y por otro se motoriza la búsqueda de conocimiento científico en la disposición y reutilización de dichos materiales. El valor agregado de los productos generados y reutilizados a nivel industrial, podría representar una importante herramienta de desarrollo para los puertos donde se pesca langostino.

La obtención de Qh, a partir de las cáscaras de langostino descartadas para la comercialización de la carne, da así solución a una problemática ambiental actual, generada por la pesca de crustáceos en las costas patagónicas.

En este proyecto de tesis, se propone el desarrollo de materiales novedosos basados en quitosano, con potenciales aplicaciones en el área biomédica. Se aspira a que esta iniciativa promueva innovaciones tecnológicas aplicables a la explotación sustentable de los recursos naturales.

## 1.7 Bibliografía

Abrusci, C, Pablos. J. et al. 2012. Photodegradation and biodegradation by bacteria of mulching films based on ethylene-vinyl acetate copolymer: Effect of pro-oxidant additives. *Journal of Applied Polymer Science*.126 (5): 1664-1675.

Ahmed. T, El-Say. K. 2014. Development of alginate-reinforced chitosan nano-particles utilizing W/O nanoemulsification/internal crosslinking technique for transdermal delivery of rabeprazole. *Life Sciences*. 110(1): 35-43.

Alcântara. A, Darder. M. et al. 2016. Bionanocomposites based on polysaccharides and fibrous clays for packaging applications. *Journal of applied polymer science*. 133(2). <https://doi.org/10.1002/app.42362>.

Ardila. L, Estupiñán. H. et al. 2011. Estudio de la biodegradación hidrolítica de recubrimientos de biopolímeros/cerámico. *Revista de Ingeniería*. 35: 41-46.

Ávila. A. 2010. Preparación de materiales biocompuestos a partir de quitosano. Estudios de aplicación. (Tesis Doctoral) FCN de la UNPSJB.

Berghoff. C. F. 2011. Desarrollo y caracterización de matrices compuestas Quitosano/Polímero sintético para regeneración de tejido óseo (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Billmeyer. F. W. 2020. *Ciencia de los polímeros*. Reverté.

Boateng. J, Matthews. K. et al. 2008. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *J. Pharm. Sci*. 97: 2892-2923.

Bogí. A, Cojazzi. G et al. 2002. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials*. 23(24): 4827-4832.

Broussard. K, Powers. J. 2013. Wound dressings: selecting the most appropriate type, *Am. J. Clin. Dermatol*. 14: 449-459.

Cabrera. J, Mondino. A. et al. 2008. Síntesis y caracterización de hidrogeles de alcohol polivinílico – polivinil pirrolidona obtenidos con radiación gamma. *dspace.ipen.gob.pe-Lima. Perú*: 92-97.

- Cascone. M, Barbani. N. et al. 2001. Bioartificial materials based on polysaccharides. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 12(3): 267-281.
- Castillo Valero. E, Quintero Rodríguez. I. Guía ambiental para el proceso de transformación del polipropileno mediante la técnica de inyección.
- Catauro. M. et al. 2015. Influence of the polymer amount on bioactivity and biocompatibility of SiO<sub>2</sub>/PEG hybrid materials synthesized by sol-gel technique. *Materials Science and Engineering: C* 48: 548-555.
- Chen. Q, Liang. S. et al. 2013. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*. 38(3-4): 584-671.
- Colorado Cañola. A. et al. 2013. Identificación de biomateriales para uso en ingeniería de tejido de piel-revisión.
- Colorado. A, Agudelo. C. et al. 2010. Analysis of Biomaterials for use in skin tissue engineering. *Biomed. Eng.* 14: 11-23.
- Coreño-Alonso. J, Méndez-Bautista. M. 2010. Relación estructura-propiedades de polímeros. *Educación química*. 21(4):291-299.
- Covas. C. 2006. Estudios sobre quitina y quitosano (tesis doctoral). Universidad de La Habana, Cuba
- Croisier. F, Jérôme. C. 2013. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*. 49(4): 780-792.
- Domard. A, Cartier. N. 1989. Glucosamine oligomers. Preparation and characterization. *Int J Biol Macromol*. 11: 297-302.
- Enoch. S, Leaper. D. 2008. Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*. Elsevier. 26(2): 31-37.
- Etimología y origen de algunos términos científicos. Universidad de Valencia <http://www.uv.es/~jaguiar/historias/etimol.html>. 2013.
- Geyer. R, Jambeck. J. et al. 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made - Supplementary Information. *Science Advances*. 3(7): e1700782.
- Ghosh. P. 2001. *Polymer Science and Technology: Plastics, Rubbers, Blends and Composites*. McGraw-Hill. 2<sup>a</sup> Ed: 5.

Gomes. M. et al. 2013. Natural polymers in tissue engineering applications. Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics. [S.l.] Elsevier. 16: 385 – 425.

Gómez Cardozo. J. 2013. Producción y caracterización de polihidroxicanoatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos. (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia)

Gomez Tardajo. 2013. Nuevos materiales de interés biomédico a partir de la funcionalización de vinilpirrolidona. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid-facultad de ciencias químicas-Departamento de Química Física I.

Gómez-Guillén. M., Giménez. B. et al. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. Food hydrocolloids, 25(8), 1813-1827.

Góngora. M. E. 2011. Dinámica y manejo de la captura incidental de peces en la pesquería del langostino patagónico (*Pleoticus Muelleri*) (Doctoral dissertation).

Gonzalez. P, Esteves. J. 2008. Relevamiento de la situación ambiental urbana en la zona costera patagónica. Proyecto GEF-PNUD ARG/02/G31. “Consolidación e Implementación del Plan de manejo de la Zona Costera Patagónica para la Conservación de la Biodiversidad” Agencia Implementadora: Fundación Patagonia Natural. Compilado en Puerto Madryn: Fund.Patagonia Natural. 1a ed.

Goycoolea. F. et al. 2000. Chitin and chitosan. Developments in Food Science. 41: 265-308.

Haines. L, Rajagopal. K. et al. 2005. Light-activated hydrogel formation via the triggered folding and self-assembly of a designed peptide. Journal of the American Chemical Society. 127:17025-17029.

Hidalgo. C, Fernández. M. et al. 2009. Estudio de quitosanos cubanos derivados de la quitina de la langosta. Revista Iberoamericana de Polímeros. 10: 11-27.

IUPAC Compendium of Chemical Terminology. The Gold Book edición online. <http://goldbook.iupac.org/>. 2013.

Jaimes Aguirre. L. 2016. Obtención y caracterización de nanopartículas poliméricas de ácido poli (láctico-co-glicólico)/ácido poli (gama-glutámico) conjugadas con ácido fólico

para el transporte y liberación de doxorrubicina (Master's thesis, Universidad Autónoma del Estado de México).

Joshi. A, Fussell. G et al. 2006. Functional compressive mechanics of a PVA/PVP nucleus pulposus replacement. *Biomaterials*. 27: 176-184.

Keskin. D, Tezcaner. A. et al. 2005. Collagen–chondroitin sulfate-based PLLA–SAIB-coated rhBMP-2 delivery system for bone repair. *Biomaterials*. 26(18): 4023-4034.

Kim. J, Lee. K. et al. 2008. Synthesis and evaluation of novel biodegradable hydrogels based on poly (ethylene glycol) and sebacic ácido as tissue engineering scaffolds. *Biomacromolecules*. 9:149-157.

Kim. T, Silva. J. et al. 2011. Enhanced functional properties of tannic acid after thermal hydrolysis. *Food Chem*. 126(1): 116-120.

Kirchhof. S, Goepferich. A. et al. 2015. Brandl, Hydrogels in ophthalmic applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm*. doi:10.1016/j.ejpb.2015.05.016.

Lakouraj. M, Tajbakhsh. M et al. 2005. Synthesis and Swelling Characterization of Cross-linked PVP/PVA Hydrogels. *Iranian Polymer Journal*. 14:1022-1030.

Langer. R, Tirrell. D. 2004. Designing materials for biology and medicine. *Nature*. 428(69): 482-487.

Lárez Velázquez. C. 2006. Quitina y Quitosano: Materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances de Química* 1(2): 15-21.

López Serrano. F, Mendizábal. E. 2015. Introducción a la ciencia de los polímeros. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. <https://www.researchgate.net/publication/286457627>.

MacNeil. S. 2008. Biomaterials for tissue engineering of skin. *Materials today*. 11(5): 26-35.

Mandujano Tazza. N. P. 2020. Biopolímeros microbianos: aplicaciones en biomedicina y farmacia.

Mano. J, Silva. G. et al. 2007. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *Journal of The Royal Society Interface*. 4(17): 999-1030.

- Mármol. Z et al. 2004. Desacetilación termo alcalina de quitina de conchas de camarón. *Multiciencias*. 4(2). <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=904/90440203>.
- Martinelli. M, Aldana. A et al. 2011. Preparation and characterization of chitosan/genipin/poly(N-vinyl -2-pyrrolidone) films for controlled release drugs. Elsevier Editorial System(tm) for Materials Chemistry and Physics. 134(1): 317-324.
- Mayet. N, Choonara. Y. et al. 2014. A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems, *J. Pharm. Sci.* 103: 2211-2230.
- Mei Liu, Yibin Zhou. et al. 2013. Preparation and structural analysis of chitosan films with and without sorbitol. *Food Hydrocolloids*. 33: 186-191.
- Metcalfe A, Ferguson. M. 2007. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *Journal of the Royal Society, Interface/the Royal Society*. 4(14):413-37.
- Mogosanu. G, Grumezescu. A. 2014. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing, *Int. J. Pharm.* 463:127-136.
- Moreno Corrales. F. V. 2016. Incidencia de la acumulación de envases de polietileno de alta densidad (hdpe) en la contaminación ambiental de la ciudad de Latacunga, durante el período 2015-2016 (Bachelor's thesis, LATACUNGA/UTC/2016).
- Mutlu. H, Meier. M. 2010. Castor oil as a renewable resource for the chemical industry. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 112 (1):10-30.
- Muzzarelli. R. 2009. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydr. Polym.* 77: 1-9.
- Nair. L, Laurencin. C. 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 32(8-9): 762-798.
- Osorio-Delgado. M, Henao-Tamayo. L. et al. 2017. Biomedical applications of polymeric biomaterials. *DYNA* 84(201): 241-252.
- Paladines Salcedo. X. 2016. La caída de los precios del petróleo y la inversión en el sector de la construcción en Guayaquil período 2015-2016. Master's thesis, Universidad de Guayaquil Facultad de Ciencias Económicas.

- Parada, L, Crespín, G. et al. 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista iberoamericana de polímeros*. 5(1): 1-16.
- Peppas, N, Langer. R. 1994. New challenges in BioMaterials. *Science*. 263:1715-1720.
- Pérez, J. M. G. 2014. La edad de los polímeros: un mundo de plástico. Universidad de Burgos, Servicio de Publicaciones e Imagen Institucional. DO 10.13140/RG.2.1.4762.1845.
- Pillai, O, Panchagnula. R. 2001. Polymers in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*. 5(4): 447-451.
- Porta, F, Baruj, G. 2017. Centro Interdisciplinario de Estudios en Ciencia, Tecnología e Innovación CIECTI.
- Rabea, E. et al. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 4(6):1457-1465.
- Richter, A, Paschew, G. et al. 2008. Review on Hydrogelbased pH Sensors and Microsensors. *Journal. Sensors*. 8(1):561-581.
- Rinaudo, M. 2006. Chitin and Chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science*. 31(7): 603 – 632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>.
- Rivero, S, García, M. 2010. Crosslinking capacity of tannic acid in plasticized chitosan films. *Carbohydrate Polymers*. 82(2): 270-276.
- Rodríguez, S, Orrego A. 2016. Aplicaciones de mezclas de biopolímeros y polímeros sintéticos: revisión bibliográfica. *Revista Científica*. 25:252-264.
- Rogovina, S, Vikhoreva, G. 2006. Polysaccharide-based polymer blends: Methods of their production. *Glycoconjugate Journal*. 23(7): 611-618.
- Rotta, J, Ozório, R. et al. 2009. Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. *Materials Science and Engineering*. 29(2): 619-623.
- Sahiner, N, Sagbas, S. et al. 2016. Biocompatible and biodegradable poly (Tannic Acid) hydrogel with antimicrobial and antioxidant properties. *International Journal of Biological Macromolecules*. 82:150-159.

- Sahoo. S, Sasmal. A. et al. 2010. Synthesis of chitosan–polycaprolactone blend for control delivery of ofloxacin drug. *Carbohydrate Polymers*. 79(1): 106-113.
- Salazar. Herrera. 2015. *Quid*. 25: 69-78. ISSN: 1692-343X, Medellín-Colombia.
- Sionkowska. A. 2011. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials. *Progress in polymer science*. 36(9): 1254-1276.
- Smith. M, Grant. M. et al. 1995. Poly (vinyl chloride) formulations: acute toxicity to cultured human cell lines. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 7: 453-459.
- Snair. L, Laurencin. C. 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 32(8–9): 762-798.
- Tello Palma. E. 2017. Evaluación del quitosano obtenido a partir de escamas de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) por métodos químicos y biológico.
- Thakur. V, Thakur. M. et al. 2014. Raw natural fiber–based polymer composites. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. 19(3): 256-271.
- Tian. H. et al. 2012. Biodegradable synthetic polymers: preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science*. 37(2): 237 – 280.
- Torres-Huerta. A, Palma-Ramírez. D. et al. 2014. Comparative assessment of miscibility and degradability on PET/PLA and PET/chitosan blends. *European Polymer Journal*. 61: 285-299.
- Townsend. C, Beauchamp. R. et al. 2017. Sabiston. *Tratado de cirugía: fundamentos biológicos de la práctica quirúrgica moderna*. Elsevier Health Sciences.
- Treat. J, Williams. R. 2017. Our 9,000. Year Lavé Affair With Booze. *National Geographic*, January. 17.
- Usero. R, Suárez. N. 2010. Electrospinning de poliésteramidas biodegradables. Proyecto/Trabajo final de carrera. Escola d'Enginyeria de Barcelona Est - E. T. Industrial, especialitat en Química Industrial: 183.
- Valencia-Gómez. L, Martel-Estrada. S. et al. 2016. Apósitos de polímeros naturales para regeneración de piel. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*. 37(3): 235-249.
- Valenzuela Chamorro. C. L. 2006. Obtención de quitosano de pota (*Dosidicus gigas*) empleando altas dosis de radiación gamma.

Van Seville. E, Wilcox. C. et al. 2015. A global inventory of small floating plastic debris. *Environmental Research Letters*. 10(12): 124006.

Vroman. I, Tighzert. L. 2009. Biodegradable polymers. *Materials*. 2(2): 307-344.

Yakimets. I, Wellner. N et al. 2005. Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. *Polymer*. 46(26): 12577-12585.

Young. R, Lovell. P. 2011. *Introduction to Polymers*, 3<sup>a</sup> Ed, CRC Press.

Yúfera. E. *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*, Volumen 2. [pslc.ws/spanish/index.htm](http://pslc.ws/spanish/index.htm).

Zhang. Y, Chan. H. et al. 2013. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 65(1): 104-120.

Zink. T, Geyer. R. et al. 2018. Toward estimating displaced primary production from recycling: A case study of US aluminum. *Journal of Industrial Ecology*. 22(2): 314-326.

## Capítulo 2 – Objetivos

### 2.1 Motivaciones

La demanda cada vez más grande de productos plásticos, por un lado, y la disposición final de los residuos que esta industria genera, por otro, son dos grandes inconvenientes que afectan negativamente al medio ambiente y a la calidad de vida del ser humano. En la actualidad, existe la necesidad de buscar alternativas que conduzcan a la sustentabilidad ambiental. Una de estas herramientas es la "química verde", concepto que contempla el diseño de productos y procesos, que reduzcan la generación de sustancias contaminantes y maximicen la eficiencia en la utilización de recursos materiales y energéticos. El empleo de materiales extraídos de recursos renovables y la reutilización de los desechos generados contribuyen positivamente a este objetivo. La química verde es aplicable en diferentes campos, tales como, la medicina, la agricultura, la industria química y farmacéutica entre otras.

La acumulación en las playas patagónicas de residuos de la industria pesquera constituye un problema medioambiental que las autoridades locales deben atender. Desde los grupos de investigación de las universidades, tanto locales como de otras provincias, se trabaja para aportar soluciones alternativas a esta problemática.

El quitosano, obtenido de los residuos de crustáceos extraídos en las costas del Golfo San Jorge, es un polímero que puede aprovecharse en distintas aplicaciones en variadas industrias, entre la que se encuentra la biomédica. La comunidad científica estudia constantemente nuevos y mejorados productos farmacéuticos, a partir de este biopolímero.

El presente trabajo de investigación tiene como motivación contribuir al desarrollo de la química verde y sustentable en la región, utilizando los desechos de caparzones de crustáceos como materia prima, para generar un producto con potencial uso en la industria biomédica.

## 2.2 Objetivo General

Es objetivo general de esta tesis: Desarrollar materiales novedosos, basados en quitosano, para ser utilizados como apósitos para cicatrizar heridas, y así, promover innovaciones tecnológicas aplicables a la explotación sustentable de los recursos naturales. De este modo, se aumenta el valor agregado del quitosano y se contribuye a la solución de un problema medioambiental actual.

## 2.3 Objetivos Específicos

a) Optimizar la metodología de extracción de quitina a partir de los caparzones de langostinos extraídos como productos de desecho del Golfo San Jorge y su posterior conversión a quitosano.

b) Modificar químicamente al quitosano, mediante el empleo de otros polímeros naturales, tales como gelatina, u otros polímeros sintéticos para la obtención de un material tipo *films*, con excelentes propiedades mecánicas sin pérdida de su capacidad de biodegradación.

c) Comparar las propiedades de los *films* obtenidos a partir de quitosano de langostino con otros polímeros y así demostrar su potencialidad para ser utilizado en la preparación de apósitos con utilidad biomédica.

d) Incorporar a los materiales sintetizados una droga de interés y con propiedades farmacéuticas, como cicatrizante, para obtener un producto novedoso y útil en la industria medico-farmacéutica. Evaluar la fijación y liberación de dicha droga.

e) Contribuir al cuidado del medio ambiente. Este último objetivo refleja el impacto regional de este Trabajo de Tesis, ya que Comodoro Rivadavia es una ciudad costera, en la cual se acumulan los desechos mencionados.

## Capítulo 3 – Materiales y Métodos

### 3.1 Objetivo

Detallar y describir todos los reactivos, materiales y metodologías empleadas para el desarrollo de la parte experimental de esta tesis.

### 3.2 Reactivos

Aceites esenciales comerciales de clavo de olor (Cl) y de canela (CA), ácido acético glacial (HAc, Wiener), ácido clorhídrico (HCl, Wiener), ácido tánico (AT, Sigma), buffer carbonato pH 9, buffer fosfato pH 7,4, gelatina de pescado (GP), gelatina tipo A (GA, Aldrich), genipín (Gen, Waco), glicerol (Gli, Aldrich, 99%), heparina sódica (Hep, Wiener, cada ml de la solución contiene 5.000 UI de heparina sódica), hidróxido de sodio (NaOH, Wiener), nitrato de cerio ( $Ce^{+3}$ , Fluka), polivinilpirrolidona (PVP, Britania), quitosano comercial (Qhc 85% DA, LMW, Aldrich), quitosano extraído de cáscaras de langostinos (Qhl), sorbitol (Sor, Britania), suero de leche descremada (La Serenísim).

Todos los reactivos usados fueron de grados analíticos y utilizados sin previa purificación.

### 3.3 Material de vidrio

Embudo, Erlenmeyer, Placas de Petri de 6 mm de diámetro, Vaso de precipitados, Varilla de vidrio.

### **3.4 Equipos utilizados**

Balanza analítica (Mettler Toledo New Classic MF - Modelo MS 204S), calentador con agitador magnético (DLAB MS-H-S), centrífuga (Arcano), equipo de fermentación diseñado en el laboratorio especialmente para este trabajo (canastilla de acero), estufa (Dalvo Instrumentos), imanes, mortero y pilón, peachímetro (Oakton pHtester2), termómetro.

### **3.5 Caracterización**

Se detallan a continuación las metodologías empleadas para caracterizar los distintos polímeros empleados en esta tesis. Una vez obtenidos o sintetizados, es necesario estudiar su estructura química, su microestructura y sus propiedades finales; por ello fue necesario caracterizarlos.

Los biomateriales, tanto naturales como semisintéticos, poseen características en masa y de superficie que deben determinarse a los efectos de predecir el comportamiento de los mismos. La estructura y composición de la superficie a escala molecular gobiernan la interacción entre el material polimérico y el medio con el cual están en contacto. Se debe determinar su composición química, pureza, estabilidad y degradabilidad, así como también estudiar y definir las posibles interacciones con la superficie que vayan a reaccionar.

Caracterizar polímeros es más complejo que caracterizar compuestos de bajo peso molecular. Las diferentes técnicas disponibles plantean requerimientos específicos en cuanto a cantidad de muestra y acondicionamiento del material a ensayar. (Coreño Alonso. J. et al. 2010)

#### **3.5.1 Determinación de estructuras por Métodos Espectroscópicos**

Para dilucidar los grupos funcionales presentes en el material polimérico se emplean métodos espectroscópicos vibracionales, como infrarrojo, Raman, Resonancia Magnética

Nuclear (NMR de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ), resonancia de spin electrónico (ESR), electrónicos (UV-visible, fluorescencia,) entre otros. Mientras que, entre los métodos aplicados al análisis de superficies poliméricas se puede mencionar la espectroscopia infrarroja de reflectancia total atenuada. (ATR) (Pastor. J. et al. 2003)

### **3.5.1.1 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)**

Esta metodología se basa en la excitación de los modos vibracionales de las moléculas e involucra el uso de radiación electromagnética en el rango infrarrojo (aproximadamente entre  $4000$  y  $300\text{ cm}^{-1}$ ) para caracterizar enlaces químicos. La vibración de una estructura determinada se analiza en términos de los grados de libertad que dicha estructura posee. La luz infrarroja está en el mismo rango de frecuencia que la molécula en vibración, de manera que, al ser irradiada, esta última absorberá aquellas frecuencias de la luz que sean exactamente iguales a las frecuencias de vibración de los distintos enlaces que la constituyen. De esta manera, la absorción de energía producida será a longitudes de onda específicas para cada enlace presente.

En la Espectroscopia por transformada de Fourier se hace incidir todo el espectro de longitudes de onda sobre la muestra varias veces. Este instrumento está basado en el principio del interferómetro de Michelson. La transformación de Fourier se utiliza como método matemático para el desarrollo en serie de la curva obtenida o interferograma. La transformada de Fourier del interferograma es el espectro ordinario obtenido por aparatos convencionales de infrarrojo.

La ventaja de esta metodología es que mejora la resolución de los espectros y que se obtiene mejor sensibilidad, como consecuencia de una mayor energía de flujo del haz de luz hasta llegar al detector y la mejora de la relación señal/ruido por promediación de interferogramas. (Asensio. R. et al. 2009)

De este modo, el espectro IR de un compuesto es la representación de la absorción que ocurre en la región infrarroja en función de la frecuencia de radiación. La cantidad de radiación absorbida se mide como porcentaje de transmitancia (%T). Teniendo en cuenta que cada molécula o grupo funcional posee una absorción determinada a una longitud de

onda característica, a partir del espectro es posible identificar los grupos funcionales de cada compuesto.

Los espectros fueron realizados en un equipo Nicolet iN10 (Thermo Scientific, USA) empleando un detector enfriado con nitrógeno líquido de Mercurio Cadmio Telurio 7800-650  $\text{cm}^{-1}$  (MCT-A) o de temperatura ambiente 7600-450  $\text{cm}^{-1}$  (DTGS), según la muestra. Se obtuvieron espectros a partir del promedio de al menos 64 mediciones con una resolución de 8  $\text{cm}^{-1}$ . Las muestras fueron depositadas en un espejo de plata y analizadas por el modo reflexión. El módulo ATR empleado es de Ge modelo 350 y fue acoplado a través del módulo IZ-10 al Microscopio antes mencionado. Se procesaron los espectros utilizando el programa Omnic 8.3. (STAN-CONICET 3443. FCQ-UNC)

### **3.5.1.2 Espectrofotometría ultravioleta/visible (UV-visible)**

La Espectroscopia ultravioleta/visible (UV-Vis) es útil como una técnica analítica ya que se puede utilizar para identificar ciertos grupos funcionales en las moléculas. A diferencia de la espectroscopia IR, esta implica la absorción de radiación electromagnética para el rango de 200-800 nm y la posterior excitación de electrones a una energía más alta de estado. (Cuahuizo. H. 2016)

La absorción de ultravioleta/luz visible por moléculas orgánicas se limita a ciertos grupos funcionales (cromóforos) que contienen electrones de valencia de baja energía de excitación. El espectro UV-Vis es complejo y aparece como una banda de absorción continua debido a la superposición de rotación y transiciones vibratorias en las transiciones electrónicas dando una combinación de líneas superpuestas. Con la espectroscopia UV-Vis es posible investigar transferencias de electrones entre orbitales o bandas de átomos, iones y moléculas existentes en fase gaseosa, líquida y sólida. (Kumirska et al. 2010).

La ley Fundamental en que se basa los métodos espectrofotométricos es la ley de Lambert – Beer en el cual establece que existe una relación lineal entre la absorbancia y la concentración y el camino óptico. (Martínez Osorio. F. 2009).

Las mediciones se efectuaron en los espectrofotómetros Shimadzu MultiSpect 1810 y 1800. Los espectros fueron adquiridos entre 200-1100 nm a 25 °C con velocidad media de barrido, utilizando celdas de cuarzo o plástico según correspondiera con paso óptico de 1 cm. Para graficar y procesar los datos se empleó el programa OriginPro 8.0. (Laboratorio Química Orgánica. FCQ-UNC)

### 3.5.2 Propiedades Mecánicas

Existe un gran número de factores estructurales, junto con la composición química, que determinan la naturaleza del comportamiento mecánico de los materiales poliméricos, entre los que se destacan: peso molecular, entrecruzamiento y ramificación, cristalinidad y morfología cristalina, copolimerización, mezclas, plastificación, orientación molecular y cargas. También ciertas variables externas determinan el comportamiento mecánico de un material, ellas son, temperatura y tiempo (frecuencia o velocidad de deformación), presión, amplitud del esfuerzo o la deformación, modo de deformación aplicado (tracción, compresión, flexión o cizalla) e historia térmica. (Coreño Alonso. et al. 2010) Los ensayos mecánicos tradicionalmente más usados son:

**3.5.2.1 Fluencia:** se aplica un esfuerzo constante a la muestra y se evalúa la deformación experimentada en el tiempo.

**3.5.2.2 Relajación de esfuerzos:** se le impone a la muestra una deformación constante y se mide la evolución del esfuerzo con el tiempo.

**3.5.2.3 Mecánico-dinámicos:** se basa en la aplicación de un esfuerzo (o deformación) sinusoidal y se estudia el desfase existente entre el estímulo (esfuerzo/deformación) y la respuesta (deformación/ esfuerzo).

**3.5.2.4 Esfuerzo-Deformación:** Se somete al material a una deformación variable manteniendo constante la velocidad de deformación y se evalúa el esfuerzo que soporta el material en cada momento.

Estos últimos son los más ampliamente utilizados a nivel industrial. Se realizan diagramas Esfuerzo-Deformación  $\sigma$ - $\epsilon$  como se observa en el ejemplo de la *Figura 3.1*.

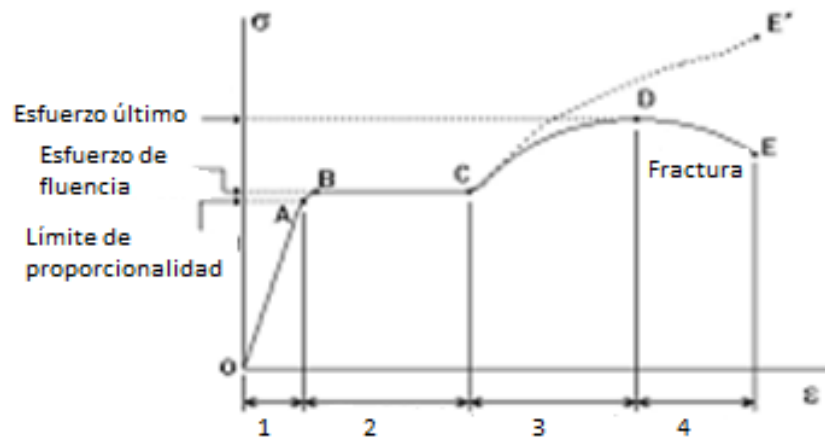


Figura 3.1 Curva Esfuerzo ( $\sigma$ ) – Deformación ( $\epsilon$ )

(García. D. 2004)

La *Figura 3.1* es una curva típica del esfuerzo contra la deformación que muestra algunos de los puntos importantes. En el eje de abscisas se observa una región lineal (1), una de plasticidad perfecta o fluencia (2), la zona de endurecimiento por deformación (3) y por último la zona de estricción (4).

Los diagramas de esfuerzo-deformación proporcionan información sobre el esfuerzo de tracción, fuerza de tracción por unidad de superficie, soportada por la probeta durante el ensayo; la rigidez del polímero, oposición del material a deformarse; la resistencia a la tracción, definida como el esfuerzo máximo soportado por la probeta antes de romper y la tenacidad del material, calculada como el área bajo la curva esfuerzo-deformación, que representa el trabajo requerido para romper el material. La rigidez del sistema se determina a partir de la pendiente de la curva  $\sigma$ - $\epsilon$  a bajas deformaciones (inferiores al 2-3%), que recibe el nombre de Módulo elástico. Este módulo se asocia con el comportamiento elástico del material, de tal manera que si cesa la fuerza que origina la deformación, el material recupera su forma y dimensiones iniciales. Al continuar con el proceso de deformación se excede el límite exclusivamente elástico y si se continúa el estirado se alcanza la zona de la deformación plástica, definiéndose esta como la deformación permanente que se mantiene en el polímero una vez que cesa la fuerza que la origina. Como los materiales poliméricos son viscoelásticos, una vez sobrepasado el punto de fluencia la deformación total está constituida por dos componentes, la elástica

(recuperable) y la plástica (remanente), existiendo, por tanto, una pequeña recuperación, aunque el polímero se encuentre en la zona de grandes deformaciones. La característica que determina que un polímero presente una curva u otra es la localización de su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), respecto a la temperatura a la que se realiza el ensayo. Los polímeros más usados en la vida cotidiana que poseen valores de  $T_g$  elevados a temperatura ambiente son capaces de soportar una gran fuerza antes de romperse sufriendo solo una muy pequeña deformación y, por lo tanto, son resistentes y de alto módulo, pero no tenaces, de grandes deformaciones.

La resistencia a la tracción es el esfuerzo máximo que un material puede resistir antes de romperse, bien por fractura o por deformación del material. Uno de los procesos de deformación en fase sólida más explotado es el estirado en frío, que favorece, generalmente, el aumento de la tenacidad y de la resistencia a la tracción provocando una orientación molecular del polímero y el consiguiente incremento de su módulo elástico. Generalmente los procesos de deformación en frío se realizan por debajo de la temperatura de recristalización y los de deformación en caliente se llevan a cabo por encima de esta temperatura. (Arreola. R. 2011)

Algunos factores estructurales que determinan el comportamiento mecánico de los materiales poliméricos son:

Cristalinidad: los polímeros pueden presentarse en un estado desordenado, conocido como amorfo, o en un estado ordenado denominado cristalino. Las propiedades finales de los polímeros vienen condicionadas por la relación amorfo/cristal y por la perfección, la morfología y tamaño de las entidades cristalinas. Generalmente la cristalinidad se ve favorecida en polímeros que tienen cierta simetría en la cadena permitiendo un elevado empaquetamiento de las unidades del polímero. Las interacciones entre cadenas también favorecen la cristalinidad.

Las condiciones de procesado y la historia térmica impuestas a la muestra también tienen influencia sobre la cristalinidad. Si luego del fundido la muestra es enfriada lentamente, el polímero tiene tiempo suficiente para que sus moléculas se organicen y cristalicen, originándose cristales más perfectos y de mayor tamaño.

Efecto de los Plastificantes: la influencia de la plastificación en polímeros amorfos se deriva del correspondiente cambio en la ubicación de su  $T_g$ . Los plastificantes son

moléculas pequeñas que se adicionan para aumentar, habitualmente, la flexibilidad de las cadenas macromoleculares. Consecuentemente, se observa una disminución del módulo de elasticidad y del esfuerzo en el punto de fluencia. A pesar de su propósito primario de aumentar la flexibilidad, este agregado puede conducir a que el comportamiento dúctil de un polímero se transforme en uno frágil.

Factores externos que determinan el comportamiento mecánico:

Temperatura: el comportamiento mecánico de los polímeros depende de la temperatura de medida respecto a su Tg. Por ello para su utilización en una aplicación concreta hay que conocer su respuesta mecánica en el intervalo de temperaturas de interés.

Influencia de la velocidad de deformación: para los polímeros rígidos, a medida que aumenta la velocidad del ensayo, en general, aumentan tanto el módulo de elasticidad, el esfuerzo en el punto de fluencia como el esfuerzo a rotura. Por el contrario, el alargamiento a rotura disminuye. Algunos polímeros violan dicho principio en determinadas condiciones experimentales que favorecen la formación de micro cavidades durante el estirado, observándose descenso del módulo elástico y del esfuerzo en el punto de fluencia por encima de una velocidad de estirado denominada como crítica.

Efecto de la presión hidrostática: en el caso de los elastómeros, cuando no tienen huecos o cargas que puedan inducir a la formación de vacíos a presión atmosférica, el efecto de la presión es pequeño. Por esta razón se los considera incompresibles. En el caso de los polímeros rígidos, el módulo y el esfuerzo de fluencia aumentan con la presión. Los esfuerzos de tracción tienden a aumentar en los polímeros dúctiles y a disminuir en los frágiles. La deformación a rotura también presenta un comportamiento dual con la presión, de modo que aumenta ligeramente en los polímeros dúctiles, pero disminuye en el caso de los frágiles.

Efecto del modo de deformación: la imposición de una deformación de tracción maximiza la existencia de defectos y provoca su colapso de modo que el polímero se muestra frágil, siempre que su concentración sea elevada y la temperatura de medida sea relativamente inferior a su Tg. En cambio, si la deformación se aplica en compresión, dichos defectos tienden a cerrarse, minimizándose su presencia. Por otro lado, la aplicación de un esfuerzo de flexión implica que la muestra está sometida a una combinación de deformaciones de

tracción y compresión simultáneamente. La componente de tracción aparece en el extremo de la muestra mientras que la de compresión se manifiesta en el punto de aplicación del esfuerzo.

En este trabajo de tesis, las propiedades mecánicas fueron evaluadas utilizando un texturómetro TA-XT2i (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK) en el modo “tensile strength” (perteneciente a la Universidad Nacional de Córdoba). El ensayo se realizó a temperatura ambiente y a una velocidad de 0,1 mm/s.

### **3.5.3 Propiedades de Transporte**

El estudio de las propiedades de transporte de polímeros define parámetros que resultan de vital importancia para determinar los posibles usos y aplicaciones de estos materiales. Por otro lado, la modificación de algunos de estos parámetros de transporte, como consecuencia de alguna nueva estrategia sintética o de la modificación química de un polímero comercial, ofrece como resultado, materiales con propiedades de aplicación deseadas y específicas. (García. A. et al. 2004)

Los materiales poliméricos han sido utilizados para múltiples aplicaciones. Una de ellas es el uso como membranas para separación de diferentes soluciones o permeantes. Una membrana polimérica puede ser considerada como una barrera que previene el movimiento de masas en general, pero que permite restringir o regular el paso de una o más especies a través de ella. (Jayaraman. K. et al. 2004) Tanto los de origen sintético como los de origen natural, son ampliamente estudiados para su aplicación en biomedicina. El tratamiento de heridas, y los sistemas de liberación de fármacos están siendo cada vez más explorados. En este último caso, el aumento en la necesidad de la administración controlada y dirigida de medicamentos ha llevado al desarrollo de numerosos biomateriales con biocompatibilidad y biodegradabilidad mejoradas. (Srivastava. A. et al. 2016) La propiedad de los hidrogeles de polímeros de hincharse en agua, los convierte en vehículos ideales para almacenamiento o transporte de compuestos activos. (Vashist. A. et al. 2014) Por otro lado, estos biomateriales que se utilizarán como películas para proteger heridas, deberían proporcionar un entorno húmedo en la interfase con la herida, permitir un intercambio gaseoso, actuar como una barrera para

microorganismos y remover el exceso de exudado. (Osorio-Delgado. M. et al. 2017) (Castro. N. 2011)

### 3.5.3.1 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad del material depende de diferentes etapas. Para que un gas atraviese un material de barrera en primer lugar debe solubilizarse o adsorberse en una cara, difundir por el interior del material hasta alcanzar la otra cara y luego evaporarse o resorberse en este segundo. Este transporte es posible debido al gradiente de concentración existente a través de la matriz polimérica. Este proceso se produce por saltos activados del permeante entre los micro espacios creados por cambios conformacionales en las regiones amorfas de la matriz polimérica. Así, la permeabilidad, es un proceso global en el que influyen también otros procesos como la solubilidad y la difusión de un gas o vapor. Estos tres procesos, solubilidad, difusión y permeabilidad, en forma de sus correspondientes coeficientes (S, D y P) son agrupados en lo que se conoce como propiedades de transporte.

Las medidas de permeabilidad están basadas en la medida de la cantidad de gas que consigue atravesar la película. La diferencia entre una técnica y otra es el modo de determinar la cantidad de gas permeado, ya sea por presión, volumen, peso o por medios más sofisticados como un cromatógrafo de gases.

Para medir la permeabilidad al vapor de agua de los *films*, se preparó una cámara de humedad con medición de presión y temperatura y cloruro de calcio como agente secante. (Figura 3.2) En la misma se colocó un soporte de aluminio, específicamente fabricado, que sostenía el *film*. La cámara se incubó a temperatura ambiente.

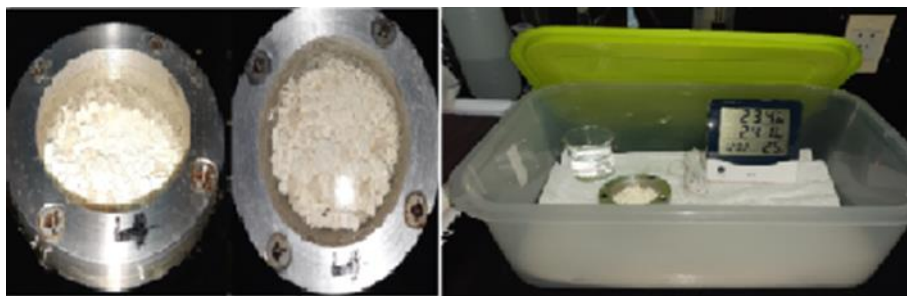


Figura 3.2 Equipo para medición de la permeabilidad al vapor de agua de los *films*

La permeabilidad al vapor de agua (WVP), en los *films*, se determinó de acuerdo a lo previsto con el método desecante descrito en la norma ASTM E96M-10. Cada *film* de aproximadamente 3,14 cm<sup>2</sup> sin alteraciones como rajaduras, burbujas u otros defectos, se coloca dentro de un recipiente de permeación de 2,0 cm de diámetro y 2,5 cm de profundidad, que contiene CaCl<sub>2</sub> anhidro para asegurar la atmosfera desecante. Una vez armado cada recipiente, se lleva a una cámara de humedad. Los recipientes de permeabilidad con los *films* son pesados en intervalos de 24 horas, durante 7 días.

La velocidad de transmisión de vapor de agua, WVTR (Kg.s<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>) y

WVP (Kg.Pa<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>) se calculan a partir de la *Ecuación 3.1* y *3.2*, respectivamente:

$$WVTR = \frac{F}{A}$$

*Ecuación 3.1 Velocidad de Transmisión de vapor de agua*

$$WVP = \frac{WVTR \cdot e}{[Sp \cdot (RH1 - RH2)]}$$

*Ecuación 3.2 Permeabilidad al vapor de agua*

Donde F es la pendiente del gráfico de variación de masa versus tiempo (Kg. s<sup>-1</sup>), A es el área de trabajo, es decir de la boca del recipiente (m), e corresponde al espesor de los *films* (m), Sp es la presión de saturación (Pa) a la temperatura de trabajo en la cámara de humedad, RH<sub>1</sub> es la humedad relativa en la cámara de humedad, y RH<sub>2</sub> corresponde a la humedad relativa dentro de la celda de trabajo.

### 3.5.3.2 Índice de Hinchamiento

El índice de hinchamiento es una medida de la capacidad del *film* de absorber un fluido a un determinado pH. En el caso del quitosano, dependerá del peso molecular y grado de desacetilación del polímero. Debido a que el quitosano posee cadenas con grupos

hidrófilos como  $-\text{NH}_2$ , posee una alta afinidad hacia el agua. Cabría esperar un aumento en el índice de hinchamiento al aumentar el grado de desacetilación ya que el contenido del grupo amino sería mayor.

La capacidad de absorción de agua de los *films* fue determinada mediante medidas de índice de hinchamiento en soluciones buffers a distintos pH (4,0 y 7,0), a temperatura ambiente.

Una masa conocida de cada *film* (entre 100 y 200 mg) fue colocada en las soluciones (ws) de cada pH, durante 2 h, hasta alcanzar el equilibrio. Los *films* hinchados fueron colectados a diferentes tiempos de exposición, luego fueron secados superficialmente y pesados. El valor del índice de hinchamiento en el equilibrio (IH %) de los *films* fue calculado usando la *Ecuación 3.3*.

$$IH \% = \frac{W_s - W_o}{W_o} \times 100$$

*Ecuación 3.3 Índice de Hinchamiento*

Donde  $W_s$  corresponde a la masa de los *films* hinchados en el equilibrio y  $W_o$  a la masa inicial de los *films*. Los estudios de hinchamiento se realizaron por duplicado y se llevó a cabo un análisis estadístico de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias significativas entre valores, mediante el test Turkey ( $p \leq 0,05$ ).

### **3.5.4 Determinación del Peso Molecular**

Los polímeros se diferencian de las moléculas de pequeño tamaño en que son sistemas polidispersos, es decir, están formados por una mezcla de cadenas de distintas longitudes, de manera que en su estado más puro un polímero es una mezcla de moléculas con una estructura química definida, pero de distinto peso molecular. Debido a esto, el peso molecular de los polímeros se define en términos estadísticos. La explicación de esta polidispersidad de los polímeros reside en las variaciones estadísticas presentes en el propio proceso de polimerización. Por tanto, cuando se habla del peso molecular de un

polímero, nos estamos refiriendo al parámetro promedio de una distribución de pesos moleculares, que se define en función de los diferentes valores de los pesos moleculares promedio. El peso molecular medio ( $M$ ) puede calcularse en función de diversas variables, siendo las más habituales el número de moléculas ( $n$ ), el peso ( $w$ ) y la viscosidad ( $v$ ) de las distintas fracciones. (Romero Peñaloza. E. 2011). Los valores obtenidos difieren según el método empleado. De entre los distintos promedios para expresar el peso molecular de una muestra destacan el peso molecular promedio en número ( $M_n$ ) descrito en la *Ecuación 3.4*, el peso molecular promedio en peso ( $M_w$ ) descrito en la *Ecuación 3.5* y otros más complejos como el peso molecular promedio viscosimétrico ( $M_v$ ), descrito en la *Ecuación 3.6*. Este último se determina utilizando un viscosímetro. El viscosímetro es un instrumento para medir la viscosidad y algunos otros parámetros de un fluido. Fue Isaac Newton el primero en sugerir una fórmula para medir la viscosidad de los fluidos. En 1884 Poiseuille mejoro la técnica estudiando el movimiento de líquido en tuberías. (Andrade. Y. et al. 2015) El viscosímetro de Ostwald consta de un tubo capilar unido por su parte inferior a un tubo más ancho curvado en forma de U, y por la parte superior a una ampolla o ensanchamiento limitada por dos señales que encierran un determinado volumen. La viscosidad de un líquido se calcula midiendo el tiempo que tarda en atravesar el tubo capilar, que como su nombre indica es lo suficientemente estrecho como para apreciar una dificultad notable en el paso del líquido. El viscosímetro debe estar completamente seco y en posición vertical, se coloca una cantidad conocida del fluido, aproximadamente 7 ml, después se procede a colocar el viscosímetro en un baño maría. Con ayuda de una manguera se succiona la muestra líquida hasta una marca y se mide el tiempo que tarda en fluir hasta la siguiente marca, bajo una diferencia medida y constante de presiones.

Luego se calcula el peso molecular viscosimétrico según ecuaciones preestablecidas como la *Ecuación 3.7*.

$$\overline{Mn} = \frac{w}{\sum N_x} - \frac{\sum N_x M_x}{\sum N_x}$$

*Ecuación 3.4* Peso Molecular promedio en número

$$\overline{M_w} = \frac{\sum N_x M_x^2}{\sum N_x M_x}$$

Ecuación 3.5 Peso Molecular promedio en peso

Donde  $w$  es el peso total de todas las moléculas en una muestra del polímero en relación al número total de moléculas presentes.  $N_x$  es el número de moléculas cuyo peso es  $M_x$ . Las sumatorias ( $\Sigma$ ) representan todas las especies poliméricas de diferente tamaño desde  $x = 1$  unidad hasta  $x = \infty$  unidades.

$$\overline{M_v} = \left[ \frac{\sum W_x M_x^\alpha}{W_x} \right]^{1/\alpha} = \sum W_x M_x^\alpha$$

Ecuación 3.6 Peso Molecular promedio viscosimétrico

Donde  $W_x$  representa la fracción de moléculas con grado de polimerización  $x$ ,  $\alpha$  es la constante de la *Ecuación de Mark-Houwink-Sakurada*. (Ecuación 3.7)

$$[\eta] = K' (M_v)^\alpha$$

Ecuación 3.7 de Mark-Houwink-Sakurada

Donde  $K'$  y  $\alpha$  son constantes determinadas experimentalmente y  $[\eta]$  es la viscosidad determinada en el experimento. De aquí se obtiene así el peso molecular promedio viscosimétrico,  $M_v$ .

El peso molecular del quitosano fue determinado por viscosimetría utilizando un viscosímetro de Ostwald. Se emplearon 7 ml de una solución del polímero de diferentes concentraciones y se determinó su viscosidad.

### 3.5.5 Determinación del contenido de Grupos Amino

Las propiedades de la quitina y el quitosano dependen en gran medida de cuan acetilados están. La mayor o menor acetilación es uno de los factores más importantes para caracterizarlos y reconocer su calidad. (Muzzarelli. R. 1993) En particular, la quitina, es caracterizada en relación a su contenido de grupos acetilo (Grado de acetilación-GA).

Se argumenta que la Qi natural posee un GA de 0,66, es decir, que 2 de cada tres de sus unidades se encuentran acetiladas. Puede decirse entonces que el GA es la fracción del total de unidades glucosídicas que están acetiladas.

Entre los diversos métodos para estimar el GA se incluyen: Análisis elemental, Hidrólisis de los grupos acetamida, Titulación potenciométrica de los grupos amino libres, Métodos espectroscópicos como IR, UV, NMR, Degradación enzimática y Pirólisis.

Usualmente una sola técnica no puede cubrir todo el rango de grados de acetilación. Debido a esto, la búsqueda de una técnica simple, rápida, de bajo costo y precisa para determinar el GA ha sido uno de los mayores retos por varias décadas. Los métodos no destructivos, por su parte, tienen la ventaja de evitar la manipulación de estos polímeros como la hidrólisis, pirólisis o derivatización. Así la espectroscopía IR es una de las técnicas más convenientes y ampliamente usada, pero hay que cuidar la reproducibilidad y además requiere una calibración usando una técnica absoluta. (Brugnerotto. J. et al. 2001)

Para el Qh, dado que se obtiene por desacetilación de la Qi, el Grado de Desacetilación (GD) es el más utilizado para caracterizarlo. Representa el contenido de grupos amino libres presentes en el polisacárido. Se lo puede definir como la proporción de unidades monoméricas de grupos acetil que se han eliminado, indicando la proporción de grupos de aminos libres en el polímero. Es importante determinar este parámetro de la manera más precisa y simple posible. Existen numerosos métodos que nos permiten calcular el grado de desacetilación, como son las técnicas espectroscópicas (IR, UV, RMN), potenciométricas y conductimétricas. (Dima. J. et al. 2013) En este trabajo se utilizó el método potenciométrico. Usualmente, en el caso del Qh de uso comercial, se establece que el grado de desacetilación se encuentre comprendido entre el 60 y 95%, dependiendo del método de fabricación usado. (Dima. J. et al. 2013) Este parámetro es importante ya que indica la carga catiónica de la molécula después de la disolución en un ácido débil.

Según algunos autores, (Li. Q. et al. 1992) los factores que afectan el GD son la concentración del álcali utilizado en la titulación, los tratamientos previos de la muestra, el tamaño de partícula empleado y la densidad de la muestra.

Las ventajas y desventajas de los diferentes métodos han sido discutidas en diversos trabajos. (Muzzarelli. R. et al. 2005) Los métodos no destructivos tienen la ventaja de evitar la manipulación de estos polímeros como la hidrólisis, pirrólisis o derivatización.

La relación entre GA y GD se muestra en la *Ecuación 3.8*.

$$GD = 1 - GA$$

*Ecuación 3.8 Relación entre GD y GA*

Para la determinación del GD por espectroscopia IR, es de utilidad la relación de absorbancias que corresponden a los grupos funcionales de amina III ( $1320\text{cm}^{-1}$ ) y  $\text{CH}_2$  ( $1420\text{cm}^{-1}$ ).

Otra relación, que fue la primera utilizada es la correspondiente a las señales de  $1550\text{cm}^{-1}$  y  $2900\text{cm}^{-1}$  ( $A_{1550}/A_{2900}$ ) en el espectro del Qh, basada en el método de la línea de base, pero luego se dejó de usar porque la absorbancia a  $2900\text{cm}^{-1}$  no se distingue bien en el espectro FTIR de la glucosamina. (Brugnerotto. J. et al. 2001)

Otras relaciones de absorbancia utilizadas para determinar el GD, incluyen los valores de absorbancia a  $1655\text{cm}^{-1}$  y  $3450\text{cm}^{-1}$  ( $A_{1655}/A_{3450}$ ) (Grant. S. et al. 1991),  $A_{1655}/A_{3450} + A_{1655}/A_{3450}$  (Toffey. A. et al. 1996) y  $A_{1655}/A_{2857}$  (Domszy. J. et al. 1980)

La curva de calibración obtenida tomando los valores de absorbancia a  $1420\text{cm}^{-1}$  como referencia y la banda característica a  $1320\text{cm}^{-1}$  muestra una correlación lineal y puede ser expresada por la relación de los valores expresados en la *Ecuación 3.9*.

$$A_{1320}/A_{1420} = 0,3822 + 0,03133.GA$$

*Ecuación 3.9 Relación de absorbancias para determinación de contenido de grupos amino*

Esta correlación es sorprendentemente buena en todo el rango de GD ( $r= 0,99$ ). Esta banda a  $1420\text{ cm}^{-1}$  fue propuesta primeramente por Peniche y col. (Peniche. C. 1991) y es claramente identificada en la comparación entre ambas unidades estructurales. (Espectros FTIR de N-acetyl glucosamina y glucosamina) (Perez Gramatges. A. et al. 1984)

El contenido de grupos amino presente en el quitosano de langostino en esta tesis fue determinado mediante el método potenciométrico utilizando un peachímetro (Oakton pHtester2) y un equipo de titulación. Para dicha determinación, se disolvieron 0.20 g del polímero en 25 ml de una solución de HCl 0.1042 M y se aforó a 100 ml con agua destilada. Se tituló con una solución de NaOH 0,1 M, la cual fué valorada previamente con biftalato de potasio como patrón primario. Se construyó una curva de titulación con dos puntos de inflexión, cuyos valores se determinaron según el criterio de la primera derivada. La diferencia entre los dos puntos de inflexión en la curva de titulación corresponde a la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del quitosano, la concentración de estos se determina utilizando la *Ecuación 3.10*.

$$\%NH_2 = 16,1 \frac{Y-X}{w} f$$

*Ecuación 3.10 Determinación del contenido de grupos Amino*

Donde Y es el punto de inflexión mayor, X es el punto de inflexión menor, ambos expresados como volúmenes, f es la molaridad de la solución de NaOH, w es el peso en gramos de la muestra y 16,1 es un valor relacionado con el peso equivalente del Qh.

### 3.6 Bibliografía

Andrade. Y, Ramírez A. et al. 2015. Obtención y caracterización de un polímero a partir del quitosano proveniente del hongo *Aspergillus niger* y cáscara de huevo. Informador técnico. 79(2): 24. Trabajo de grado (Química). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química. Santiago de Cali.

Arreola. R. 2011. Efecto de la deformación en frío sobre las propiedades mecánicas de los aceros: din32crmov12 10, aisi 4340 y aisi 8620. ing. ind. Mexico DF.

Asensio. R, San Andrés Moya. M. et al. 2009. Analytical characterization of polymers used in conservation and restoration by ATR-FTIR spectroscopy. Analytical and Bioanalytical Chemistry 395(7): 2081-2096.

Brugnerotto. J, Desbrieres. J. et al. 2001. Overview on structural characterization of chitosan molecules in relation with their behavior in solution. In Macromolecular Symposia 168(1): 1-20). Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH.

Castro. N. 2011. A New Challenge Science and Neogranadine Engineering. Green Chemistry. 21(2): 169-182.

Cuahizo. H. G. 2016. Obtención de quitosano por el método químico a partir del hongo seta (*Pleurotus Ostreatus*) y su caracterización. Tesis Licenciatura en Ingeniería Química. UAP. México.

Coreño Alonso. J, Méndez Bautista. M. 2010. Relationship between structure and properties of polymers. ISSN 0187-893X. Edu.quím. 21(4): 291-299.

Dima. J, Sequeiros. C. et al. 2013. Optimización de la obtención de quitosano de crustáceos patagónicos (Puerto Madryn, Chubut): Desarrollo de micropartículas y evaluación de su acción bactericida en patógenos de usual frecuencia en maricultura. Revista de Asociación Argentina de Ingeniería Química. 1: 19.

Domszy. J, Roberts. G. 1980. Macromol. 2: 115. 20.

Garcia. A, Iriarte. M. et al. 2004. Antiplasticization of a polyamide: a positron annihilation lifetime spectroscopy study. Polymer. 45: 2949-2957.

García. D. 2004. IX Congreso Nacional de Propiedades Mecánicas de Sólidos. Vol: 46. Universidad de Sevilla.

Grant. S, Blair. H.S. et al. 1991. Structural studies on chitosan and other chitin derivatives. *Macromol Chem.* 190: 2279-2286.

Jayaraman. K, Bhattacharya. D. 2004. Mechanical performance of wood fibre-waste plastic composite materials. *Resources, Conservation and Recycling.* 41: 307-319.

Kumirska. J, Czerwicka. M. et al. 2010. Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan. *Marine Drugs.* 8(5): 1567-1636.

Li. Q, Dunn. E. et al. 1992. Applications and properties of chitosan. *Journal of bioactive and compatible polymers.* 7(4): 370-397.

Martínez Osorio. F, Pérez Espinoza. I. 2009. Calibración de un espectrofotómetro UV-Visible y Evaluación de la incertidumbre (Doctoral dissertation).

Muzzarelli. R, Muzzarelli. C. 2005. Chitosan chemistry: relevance to the biomedical sciences. *Polysaccharides.* 1: 151-209.

Muzzarelli. R. 1993. Biochemical significance of exogenous chitins and chitosans in animals and patients. *Carbohydr. Polymer.* 20: 7-16.

Osorio-Delgado. M. et al. 2017. Aplicaciones biomédicas de biomateriales poliméricos. (Biomedical applications of polymeric biomaterials) *DYNA* 84 (201): 241-252.

Pastor. J, Jawhari1. T. et al. 2003. Caracterización de materiales polímeros mediante la utilización de la microespectroscopía vibracional (Raman, FTIR y FT-RAMAN). Departamento de Física de la Materia Condensada Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales. Universidad de Valladolid. 47011. Valladolid. España. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 4(3): 1-43.

Peniche. C, Nieto. J.M. 1991. Padrón G “Characterization of chitosan by pyrolysis–mass spectrometry, thermal analysis and differential scanning calorimetry”, *Thermochimica Acta*, 176, 63.

Perez Gramatges. A. et al. 1984. Thermodynamics of complex formation of polyacrylic acid. *Exp. Mycol. Chem. Pharm.* 43.

Romero Peñaloza. E. 2011. Obtención de hidrogeles de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger* y su estudio en la liberación controlada de cefalexina. Proyecto de trabajo de grado presentado para optar al título de químico. Universidad del Valle Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Santiago de Cali.

Srivastava. A, Yadav. A. et al. 2016. Polymers in drug delivery. *Journal of Biosciences and Medicines*. 4: 69-84.

Toffey. A, Samaranayake. G. et al. 1996. *J Appl Polym Sci* 60:75 131. Bernkop-Schnurch. A, Hornof. M. et al. 2002. *Trends Glycosci Glycotecn* 14:205 145.

Vashist. A, Gupta. Y. 2014. Recent advances in hydrogel-based drug delivery systems for the human body. *Chem. B*. 2(2): 147-166.

Velandia Cabra. J. 2017. Identificación de polímeros por espectroscopía infrarroja. *Revista Ontare*. 5: 115-140.

## Capítulo 4 – Obtención de Quitina y Quitosano

### 4.1 Objetivos

Obtener quitina a partir de cáscaras de langostino desechadas en las costas del Golfo San Jorge. Aplicar para la obtención dos metodologías diferentes y comparar sus rendimientos. Desacetilar la quitina para obtener quitosano y caracterizarlo. Preparar *films* de quitosano (comercial y de langostino) y evaluar sus propiedades.

### 4.2 Introducción

Los métodos de obtención de biopolímeros han cobrado relevancia en la actualidad, no solo por sus beneficios ambientales, sino también por su potencial industrial en biotecnología y biomedicina. La investigación científica de los últimos años ha orientado sus esfuerzos en la protección del medio ambiente, de este modo, el deterioro ecológico ha ido disminuyendo gradualmente. Los materiales más "verdes" son ampliamente utilizados, y la investigación química presta más atención al desarrollo de procesos sustentables. En este sentido, los estudios sobre polímeros naturales como la quitina (Qi) y quitosano (Qh), juegan un papel central en este momento. (Castro. N. 2011) Otros polímeros naturales ampliamente estudiados y utilizados son el alginato, dextrano, gelatina. (Altman. A. et al. 2010) (Macneil. S. 2008) Estos materiales podrían remplazar a otros ya existentes o abrir nuevas aplicaciones comerciales aprovechando ventajas como su bajo costo, la alta disponibilidad de fuentes renovables y la posibilidad de ser modificados químicamente. (Mourya. V. et al. 2008)

La Qi es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza, ocupa el segundo lugar en abundancia luego de la celulosa. (Kurita. K. 2006) Forma parte del componente estructural del exoesqueleto de artrópodos (insectos y crustáceos), formando una estructura organizada agrupada a complejos de proteínas, minerales y lípidos y de la pared celular de algunos hongos. La Qi y su principal derivado, el Qh, son empleados con éxito

en campos tan diversos como el farmacéutico, médico, la industria alimentaria, procesadora de efluentes, agricultura, entre otros. (Pacheco Lopez. N. 2010)

La Qi, en la región Patagónica, es extraída de los caparazones de crustáceos, desechados por la industria pesquera. La industrialización y comercialización de crustáceos, como langostino, centolla y camarón, en las costas patagónicas del Golfo San Jorge, genera grandes recursos económicos, pero a la vez grandes toneladas de residuo. Esto es debido a que, una vez capturados los ejemplares, solo se aprovecha la carne como recurso alimenticio y las cáscaras son acumuladas en enormes basurales, o bien enterradas en grandes piletas en la costa, o en otros casos, mucho de este desperdicio es arrojado al mar en la zona de captura o bien devuelto a este por erosión costera de las olas marinas. Por otro lado, su capacidad de degradación es lenta y así, el volumen acumulado aumenta exponencialmente con el tiempo, provocando contaminación ambiental microbiológica y visual. Esto genera impacto negativo y proliferación de microorganismos patógenos para el ser humano y animales domésticos, que utilizan estos depósitos como medio de cultivo, que a su vez atraen insectos generando una cadena de descomposición difícil de resolver. La posibilidad de obtener biopolímeros a partir de estos residuos, por un método sustentable, abre así la posibilidad de aportar una alternativa para resolver dos grandes inconvenientes, uno industrial y otro ambiental.

La composición del desecho de crustáceos en particular del langostino presenta de 30 a 60% de sales de calcio y magnesio, 20 a 40% de proteínas, 5 a 14% de lípidos y 25 a 30% de Qi. (Prashanth. K y Tharanathan. R. 2007) La especie más recogida en las costas patagónicas es el *Pleoticus muelleri*, de este se desecha aproximadamente un 13% de caparazón total húmedo. (Avila. A. et al. 2007)

### **4.3 Reseña de métodos utilizados**

En esta sección se hará un breve resumen de los procesos y condiciones de reacción utilizados en la mayoría de las técnicas para extraer Qi de los caparazones de crustáceos para luego ser transformada en Qh.

Las metodologías de extracción de Qi son diversas y dependen en gran medida del origen de la materia prima, debido a que la composición de la Qi es característica de cada especie. (Mathur. N. et al. 1990)

### **4.3.1 Etapas del procesamiento de la Quitina**

#### **4.3.1.1 Método químico**

En general, la Qi es obtenida por métodos químicos que incluyen tratamientos con álcalis para hidrolizar la proteína, la remoción de la materia inorgánica con ácidos y la decoloración, mediante agentes decolorantes, de los pigmentos presentes. Se han probado distintas modificaciones de las condiciones tales como temperatura, tiempo de reacción, concentración de reactivos, entre otros. (Mármol. Z. et al. 2011)

Los pasos consecutivos son:

- acondicionamiento de la materia prima,
- eliminación de impurezas inorgánicas mediante desmineralización con ácido diluido,
- extracción de la proteína con tratamiento de álcali diluido ó métodos alternativos,
- decoloración de la Qi obtenida.

**El acondicionamiento** del material consiste en lograr un tamaño de partículas sólidas pequeño. Esto se debe a que los tratamientos de obtención de Qi involucran reacciones químicas entre la fase sólida y la líquida y el acceso de los reactivos líquidos hasta los sitios activos. Así, al disminuir el tamaño de partícula sólida, se facilita el contacto íntimo entre las fases a fin de obtener condiciones uniformes de reacción.

**La desmineralización** (DM) consiste en eliminar el carbonato de calcio de los caparazones y normalmente se realiza con ácido clorhídrico (HCl) diluido a temperatura ambiente. La temperatura ambiente evita la degradación del polímero. Las otras variables, tiempo de reacción, reactivo y relación sólido: líquido se han modificado en distintos reportes. Se han utilizado otros ácidos como nítrico, sulfúrico, acético o fórmico. El tiempo puede variar desde media hora hasta varios días. (Dash. M. et al. 2011) Si bien la DM puede preceder a la desproteización, generalmente se realiza después, sobre todo

en materiales en los que se pretende recuperar la proteína con valor nutricional. Por otro lado, este procedimiento es más económico ya que el ácido consumido en la desmineralización actúa solamente sobre el mineral y no reacciona colateralmente, aunque sea en baja proporción, con las proteínas. (Ávila Sanabria. A. 2010) Las desventajas evaluadas en el método químico son, el uso de soluciones concentradas de ácido y álcali, la generación de gran cantidad de desechos corrosivos, que presentan efectos en el peso molecular de los biopolímeros y, por consiguiente, en sus aplicaciones, además de hacer difícil la recuperación de sub-productos como hidrolizados proteicos, calcio y pigmentos. (Pacheco Lopez. N. 2010)

**La desproteinización (DP)** comprende la remoción de la proteína de las cáscaras mediante reacciones químicas sucesivas en medio alcalino fuerte y a temperaturas elevadas. La relación entre la fase sólida, compuesta por los fragmentos de caparzones y la líquida de la solución alcalina varía de 1:5 a 1:10 expresado en gramos de sólido por mililitro de solución. Esta relación debe permitir un mezclado uniforme del medio reaccionante.

#### **4.3.1.2 Método enzimático**

Una alternativa más sustentable es el tratamiento por digestión enzimática o fermentación con bacterias proteolíticas. Varias proteínas como tripsina, pepsina y quimiotripsina han sido usadas exitosamente. (Escobedo. G. 1994) La fermentación enzimática utilizando suero de leche presenta ventajas respecto al método químico. Por un lado, el ácido láctico utilizado permite la conservación del desecho y la solubilización de los minerales y por otro; la activación de enzimas endógenas que desproteinizan el desecho. Además, la aplicación de procesos no agresivos favorece la recuperación de subproductos aumentando la factibilidad del proceso. El uso de enzimas en la producción de Qi representa una alternativa al uso de álcalis concentrados, disminuyendo la producción de efluentes tóxicos y la depolimerización del producto. (Aider. M, Halleux. D. et al. 2009) Por otro lado, existe una continua búsqueda de tecnologías efectivas que permitan el aprovechamiento del lactosuero, el cual es un subproducto de la industria láctea. (Jelen. P. et al. 2011) Diversos factores, como la temperatura y pH, pueden afectar el desarrollo

de los microorganismos en la fermentación, y como consecuencia influir en la desmineralización y desproteínización.

Una vez concluido el proceso de desproteínización y desmineralización es necesario separar el líquido sobrenadante y lavar exhaustivamente el material desmineralizado y desproteínizado hasta pH neutro.

**La etapa de decoloración** consiste en la recuperación/eliminación de los pigmentos presentes, los cuales incluyen astacenos, astaxantenos y los  $\beta$ -carotenos. La recuperación de esta materia coloreada puede ser incluida como una parte del proceso de obtención de la Qi, dado que tiene un alto valor comercial. La remoción de los pigmentos puede realizarse por extracción con etanol, cloroformo o aceite luego de la desmineralización. Los agentes convencionales de blanqueo usados para oxidar los pigmentos carotenoides son 0,5-3% de peróxido de hidrógeno o bien 0,32% de hipoclorito de sodio. (Curbelo Hernández. C. et al. 2018)

#### **4.3.2 Desacetilación de la quitina. Obtención de quitosano**

El quitosano se obtiene por desacetilación de la Qi, hidrolizando los grupos acetamida. Esta metodología utiliza hidróxido de sodio concentrado y caliente. Estas condiciones severas son necesarias debido a tres factores:

- baja reactividad debida a la configuración *trans* de los sustituyentes acetamida con respecto al grupo OH-3 del anillo piranosídico de la unidad monomérica,
- presencia de enlaces de hidrógeno entre grupos carbonilo y amida de cadenas adyacentes,
- denso empaquetamiento de las cadenas en el enrejado cristalino de la Qi, que previene el acceso del álcali a los sitios reactivos.

Los tiempos y condiciones de aplicación son variados y afectan la calidad final del material obtenido. La fuente de Qi y los incontrolados procesos de desacetilación son los principales factores que afectan las propiedades finales del quitosano. (Hidalgo. C. et al. 2009)

Las aplicaciones, tanto de la Qi como del quitosano, dependen en gran medida de la variación en su composición química, del grado de desacetilación logrado, del tamaño de la cadena polimérica y de la purificación de los mismos. (Parada. L. et al. 2004)

En general, durante la desacetilación, las condiciones de reacción se seleccionan de manera tal que se obtenga un nivel de conversión suficiente en un tiempo razonable y se origine un producto soluble en disoluciones ácidas diluidas, sin que haya una degradación significativa de la cadena polimérica. (Mengatto. L. 2010)

## **4.4 Parte Experimental**

### **4.4.1 Acondicionamiento del material**

Se trabajó con caparazones de langostinos de la especie *Pleoticus muelleri* extraídos del Golfo San Jorge. Estos materiales de descarte fueron provistos por industrias pesqueras ubicadas en la zona portuaria de la ciudad de Comodoro Rivadavia. Las cáscaras fueron lavadas para eliminar restos de arena, materia orgánica como carne y tejidos, enjuagadas varias veces con agua destilada y secadas a temperatura ambiente hasta peso constante. Luego fueron sometidas a un proceso de molienda mecánica utilizando un mortero, con el fin de obtener un tamaño de partícula adecuado ( $1 \text{ mm}^2$  aproximadamente), para su posterior procesamiento.

### **4.4.2 Método químico de extracción de quitina**

Las cáscaras previamente acondicionadas, se colocaron en un erlenmeyer junto a la solución de álcali y se calentaron con agitación constante. Se realizaron 2 combinaciones diferentes de tiempos/temperaturas/concentración de reactivo, llamados método A y B, los que se describen en la *Tabla 4.1*. La relación entre la fase sólida, compuesta por los caparazones y la líquida, compuesta por la solución alcalina, fue en un rango aproximado de 1:5 a 1:10, expresado en gramos de sólido por mililitro de solución.

Tabla 4.1 Condiciones experimentales en cada etapa de la obtención de Qi.

a Relación sólido: líquido para la DP

b Relación sólido: líquido para la DM

PROCESO	DP			DM		
Variable	NaOH (M)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	HCl (M)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
MÉTODO						
A	0,8 (1:10) <sup>a</sup>	90	95	1,3 (1:5) <sup>b</sup>	60	95
B	0,5 (1:10) <sup>a</sup>	75	70	2 (1:5) <sup>b</sup>	60	70

En cada una de las etapas del proceso, el producto obtenido fue lavado con abundante agua destilada hasta pH neutro y secado en estufa a 40°C hasta peso constante. El sólido obtenido fue nuevamente colocado en un erlenmeyer con solución de HCl, en la misma proporción sólido/solución antes mencionada. Se realizó la desmineralización en diferentes tiempos y temperaturas. Posteriormente, se determinó el rendimiento gravimétrico (RG%) de Qi obtenida a partir de caparazones secos. (Ecuación 4.1)

$$RG\% = \left[ \frac{\text{peso de producto}}{\text{peso de caparazones}} \right] \times 100$$

Ecuación 4.1 Rendimiento gravimétrico (RG%) de Qi obtenida

#### 4.4.3 Método enzimático de extracción de quitina

Los caparazones de langostino una vez limpios, secos y triturados en mortero hasta obtener un tamaño de partícula de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente, se colocaron en una canastilla de acero inoxidable diseñada especialmente para la fermentación en el laboratorio. (Figura 4.1)

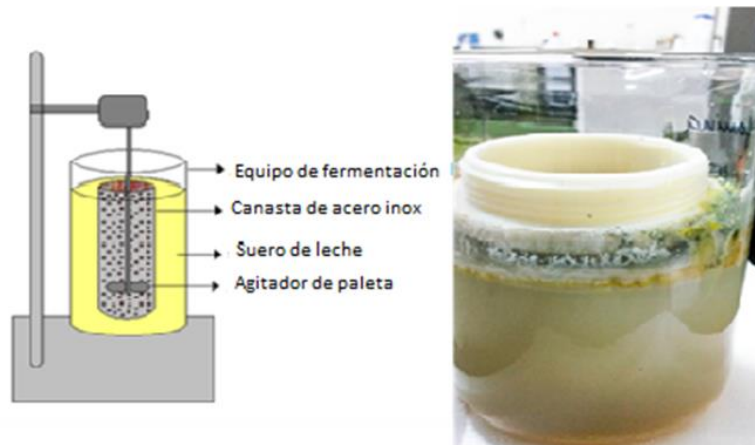


Figura 4.1 Esquema del equipo preparado para la fermentación.

La canasta se colocó dentro de un vaso de precipitados con el suero de leche, obtenido previamente por precipitación ácida de leche líquida. (Escobar. D. et al. 2014) La proporción usada de material sólido: líquido fue de 1:2. La fermentación se realizó a temperatura ambiente por un periodo variable de 7 a 12 días, con el objetivo de comparar y seleccionar el mejor rendimiento. (Tabla 4.2) La mezcla fue agitada cada 6 horas. Luego del periodo de fermentación, el sólido ( $Q_i$ ) fue separado, colado y lavado con abundante agua destilada. Finalmente, fue secado en estufa a 30°C hasta peso constante. El ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 4.2 Condiciones experimentales de la obtención de  $Q_i$  por fermentación láctica.

MÉTODO:FERMENTACIÓN LÁCTICA	Tiempo (días)	Temperatura (°C)	Relación Sólido(cáscaras)/líquido(suero)
1	7	25	1:2
2	8	25	1:2
3	9	25	1:2
4	10	25	1:2
5	11	25	1:2
6	12	25	1:2

#### 4.4.4 Desacetilación (DA) de la quitina. Obtención de quitosano

Una vez extraída la Qi se procedió a la DA para obtener quitosano de langostino (Qhl), tratándola con solución acuosa concentrada de NaOH en caliente. Se trabajó colocando la Qi previamente obtenida en un erlenmeyer con la solución de hidróxido de sodio concentrado al 50% p/v. La proporción sólido/líquido usada fue de 1:2. Se calentó a 100°C en baño de arena durante diferentes tiempos de reacción, a saber 60 y 180 minutos. Se mantuvo con agitación constante. Una vez finalizado el proceso, se enfrió la solución, se lavó exhaustivamente con agua destilada y se llevó a pH neutro. Se secó en estufa a 40°C hasta peso constante.

#### 4.4.5 Caracterización del quitosano por espectroscopía infrarroja (FTIR)

Los espectros se realizaron empleando el método descrito en el apartado 3.5.1 del capítulo anterior. Se comparó el perfil de bandas de los espectros obtenidos para quitosano comercial (Qhc) y para el extraído a partir de langostino (Qhl).

#### 4.4.6 Determinación de Peso Molecular del Qhl por método viscosimétrico (Mv)

Para la determinación del peso molecular promedio del polímero obtenido se trabajó con la *Ecuación 4.2*, donde  $\eta_0$  es el coeficiente de viscosidad de la solución,  $\beta$  es la constante determinada para el viscosímetro,  $\rho$  es la densidad de la solución a la temperatura de trabajo y  $\tau$  el tiempo de escurrimiento.

$$\eta_0 = \beta \rho \tau$$

*Ecuación 4.2 Coeficiente de viscosidad*

Graficando viscosidad reducida  $\eta_{sp} \cdot c^{-1}$  ( $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ ) en función de concentración ( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) y extrapolando a concentración cero se puede determinar la viscosidad intrínseca ( $\Pi$ ), según la *Ecuación 4.3*.

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp}/c = \lim_{c \rightarrow 0} \left( \frac{1}{c} \ln \frac{\eta}{\eta_0} \right)$$

Ecuación 4.3 Viscosidad intrínseca

El valor obtenido para  $([\eta])$  se relaciona, en la *Ecuación 4.4*, con el  $M_v$  del polímero, ya que para el caso de polímeros esféricos de ovillo aleatorio se obedece esta ecuación, donde  $K$  y  $\alpha$  son constantes que dependen del disolvente y del tipo de macromolécula. (Kassai. M. 2007)

$$([\eta]) = \kappa' (M_v)^\alpha$$

Ecuación 4.4 Peso molecular promedio viscosimétrico

El mismo procedimiento se llevó a cabo con quitosano comercial para poder comparar los resultados.

#### 4.4.7 Determinación del Grado de Desacetilación (GD) por potenciometría

Se determinó el contenido de grupos amino para el Qhc y Qhl. Para ello se disolvieron 0.20 g del polímero en 25 ml de una solución de HCl 0.1042 M y se aforó a 100 ml con agua destilada. Se tituló con una solución de NaOH 0,1 M. La valoración se llevó a cabo según lo descrito en el capítulo 3, apartado 3.5.

El GD se determinó de acuerdo a la *Ecuación 3.10* descrita en el capítulo anterior.

#### 4.4.8 Preparación de *films* de quitosano

Se prepararon *films* de Qhl. Para ello se prepararon soluciones al 2% p/v de Qhl obtenido por desacetilación de la Qi de 10 días de fermentación, en HAc al 5% v/v y se

homogeneizaron por 24 h a 40°C en agitador magnético. Se utilizó la metodología de *cold-casting* para obtener los *films*, volcando cada solución en una cápsula de Petri de polipropileno de 6 mm de diámetro y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Se prepararon *films* de Qhc a fin de comparar sus propiedades.

#### **4.4.9 Caracterización de los *films* de quitosano por FTIR**

La caracterización química y estructural de los *films* se realizó por espectroscopía infrarroja (FTIR), los espectros para cada *film* fueron obtenidos según la descripción del apartado 3.5.1.

#### **4.4.10 Determinación del Índice de Hinchamiento (IH) de los *films***

Se realizó la determinación según lo descrito en el capítulo 3, apartado 3.5.3.2 y se calculó el IH con la ecuación 3.3

#### **4.4.11 Determinación de la Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de los *films***

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) de los *films* preparados fue determinada de acuerdo a lo previsto con el método desecante descrito en la norma ASTM E96M-10 y detallada en el apartado 3.5.3.1 del capítulo anterior. Para los cálculos se utilizó la *Ecuación 3.2* también descrita en el capítulo anterior.

### **4.5 Resultados y Discusión**

#### **4.5.1 Obtención de quitina**

Se llevó a cabo la obtención de Qhl a partir de las cáscaras previamente acondicionadas. Se emplearon tanto el método químico como el enzimático. Se caracterizó el material obtenido y se calcularon los rendimientos para cada uno de los métodos.

#### 4.5.1.1 Método Químico

Los resultados obtenidos a partir del método químico (A y B), se muestran en las correspondientes tablas. En la *Tabla 4.3* se muestran las relaciones en masa del material empleado y la recuperación luego de cada etapa y en la *Tabla 4.4* los porcentajes de recuperación en cada etapa de la obtención de Qi.

*Tabla 4.3 Masas de la materia prima empleada y la recuperación luego de cada etapa de la obtención de Qi por métodos químicos*

Método Químico	Masa inicial (g)	DP (g)	DM (g)
Condiciones A	10,06 ± 0,08	6,78 ± 0,47	2,60 ± 0,14
Condiciones B	10,02 ± 0,02	6,24 ± 0,09	2,33 ± 0,07

*Tabla 4.4 Porcentajes de recuperación en cada etapa de la obtención de Qi por método químico*

Método Químico	DP (%R)	DM(%R)
Condiciones A	67,39	25,84
Condiciones B	62,27	23,25

Los porcentajes de recuperación se muestran graficados en el siguiente apartado. (*Figura 4.4*)

Se puede observar que los valores de rendimientos obtenidos en cada una de las etapas de desproteización (DP), desmineralización (DM) varían de acuerdo a las condiciones utilizadas de tiempo, concentración y temperatura. Las condiciones A arrojaron un mayor rendimiento. Al emplear mayor temperatura y mayor concentración de álcali, durante un tiempo más prolongado en la desproteización, el rendimiento fue mayor. En la desmineralización el rendimiento fue mayor también en condiciones más fuertes (A) de temperatura y concentración de ácido. Cuando se aplicó el método A las muestras obtenidas presentaron una coloración más clara. La coloración en el producto obtenido es

debida a la presencia de carotenoides. Estos resultados podrían indicar que en las condiciones del método A se obtiene una mejor purificación de los productos. (Caprile. M. 2005) Por los resultados obtenidos, las condiciones A del método químico de extracción de Qi fueron las seleccionadas para continuar. En la *Figura 4.2* se observa una fotografía de la quitina obtenida por método químico en condiciones A.



*Figura 4.2 Fotografía de quitina obtenida por método químico*

Las técnicas de extracción encontradas en la literatura son muy variadas, pues dependen en gran medida de las características de la fuente. La composición del material de partida varía notablemente de una especie a otra. La mayor parte de las técnicas desarrolladas descansan en procesos químicos de hidrólisis de la proteína y la remoción de la materia inorgánica. (Colina. M. et al. 2014)

En los desechos de crustáceos la Qi está asociada con minerales de calcio y proteínas, además de pigmentos como la astaxantina. Debido a estas pigmentaciones muchos autores recurren a procesos de despigmentación para obtener quitinas de buena calidad. (Marcia. E. et al. 2011) Se han reportado trabajos en los cuales se usaron otros ácidos para desmineralizar como: acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), fórmico ( $\text{HCOOH}$ ) dentro de los débiles y nítrico y sulfúrico ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) como ácidos fuertes para esta etapa. Otros autores han reportado ácidos fuertes como el clorhídrico ( $\text{HCl}$ ) (Roberts. G. 1992) (Majeti. N. et al. 2000) (Wang. Q. et al. 2006)

El carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) es el componente inorgánico en mayor proporción que cualquier otro mineral. (Percot. A. et al. 2003) La desmineralización ocurre cuando el  $\text{HCl}$  reacciona con el  $\text{CaCO}_3$  de acuerdo con la siguiente ecuación química:



El HCl es el agente descalcificante más común empleado en laboratorios y a nivel industrial para la producción de Qi. La concentración generalmente empleada de HCl es de 1 M. Sin embargo, otros autores reportan concentraciones de HCl de 0,25 M, lo cual hace que minimice la hidrólisis del polímero. (Methacanon. P. et al. 2003)

Autores que trabajaron con caparazón de cangrejo azul (*Callinectes sapidus*) y concha de camarón (*Litopenaeus vannamei*) para extracción de Qi, publicaron valores de rendimiento de 11,9% y 33,7% respectivamente. (Briceño. J. 2008) Valores publicados por otros autores muestran rendimientos para la extracción química de Qi de 28,8 % (Mármol. Z. et al. 2006) y 26,57 %. (Percot. A. et al. 2003)

Autores que trabajaron con caparazones de langostinos (*Pleoticus muelleri argentine*) utilizando el método químico obtuvieron un rendimiento de 29,1% Qi. (Dima. J. et al. 2013) Las condiciones utilizadas por estos autores fueron: para desmineralización ácido clorhídrico: 1,5 M, en una relación masa/volumen 1:15, a temperatura ambiente y con agitación constante, durante 3 h y 8 h. Para desproteínización: NaOH al 4,5%, con una relación masa /volumen de disolución básica de 1:15. El proceso se realizó durante 3 horas, a 70°C y con agitación constante.

Estas diferencias son atribuidas, principalmente, a las condiciones establecidas para la etapa de desmineralización (pH, tiempo, concentración de HCl y temperatura de reacción).

Respecto al proceso de desproteínización, en particular, el efecto de la concentración de NaOH y el tiempo de reacción, se publicaron trabajos en los que se encontró una mayor eficiencia en la extracción de proteínas en un tiempo entre 0,5 y 1,5 horas. (López. A. 2012)

#### **4.5.1.2 Método Enzimático**

En la *Tabla 4.5* se muestran los valores obtenidos de masa y % de Qi en los diferentes períodos de fermentación láctica. El rendimiento en la obtención de Qi por fermentación de 10 días fue de 26,65% y fue seleccionado por ser el mayor. En la *Figura 4.3 a y b* se observan las fotografías del material acondicionado para someterlo al proceso de

extracción y de la Qi obtenida a partir de las cáscaras de langostino en este trabajo. La Qi una vez seca tuvo un aspecto similar tanto al obtenido por en el método químico como en el enzimático y no presentó coloración.

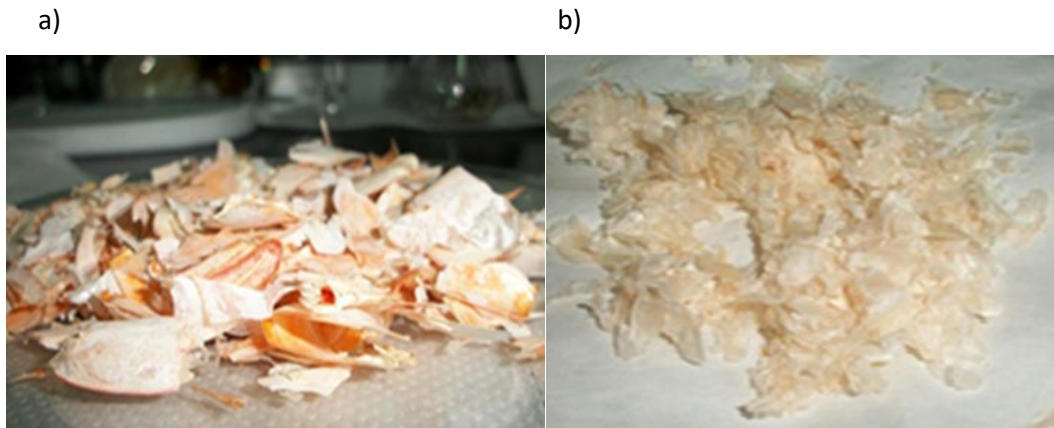
El método de extracción enzimático representa un proceso más económico, efectivo y compatible con el cuidado del medio ambiente para la producción de Qi, permitiendo fundamentalmente disminuir la generación de residuos químicos como ácidos y álcalis. (Pacheco Lopez. N. 2010)

El proceso de fermentación láctica no produce desechos corrosivos y reduce notablemente los consumos de agua y energía. El rendimiento de Qi obtenida a partir de cáscaras de langostino por fermentación láctica depende fuertemente de la materia prima de partida y de las variables de la técnica implementada: tiempo de reacción, pH y agitación, entre otras.

Otros autores que trabajaron con desechos de cangrejo (*Callinectes bellicosus*) obtuvieron Qi por fermentación biológica y obtuvieron un rendimiento de 34,4%. (Flores. A. et al. 2012) Por otro lado, autores que trabajaron con caparazones de langostinos (*Pleoticus muelleri argentine*) utilizando el método químico obtuvieron un rendimiento de 29,1% Qi. (Dima. J. et al. 2013) Estos resultados ponen en evidencia que la elección del método fermentativo para obtener Qi es acertada, ya que los rendimientos son ligeramente mayores que en el método químico con la ventaja de no generar desechos corrosivos. Por lo antes expuesto este método fue el elegido en esta tesis para continuar con la obtención de quitosano.

Tabla 4.5 Valores de obtención de Qi por fermentación láctica

Tiempo de fermentación (días)	Masa inicial cáscara (g)	Masa final Qi(g)	%R QUITINA
7	10,02	2,45	24,45
8	10,04	2,6	25,89
9	10	2,03	20,3
<b>10</b>	<b>10,02</b>	<b>2,67</b>	<b>26,65</b>
11	10,05	2,66	26,47
12	10,03	2,65	26,46



*Figura 4.3 a Fotografía de las cáscaras de langostino acondicionadas para la extracción  
b Aspecto de la Qi obtenida por proceso de fermentación*

#### **4.5.2. Obtención de Qhl por Desacetilación de la Qi**

La Qi obtenida por método enzimático, durante 10 días, fue desacetilada para obtener Qhl utilizando álcali concentrado y a temperatura elevada. El quitosano obtenido luego del proceso de desacetilación presentó un color blancuzco, pálido, translúcido, suave al tacto, sin olor ni restos de pigmentos. (Figura 4.4)



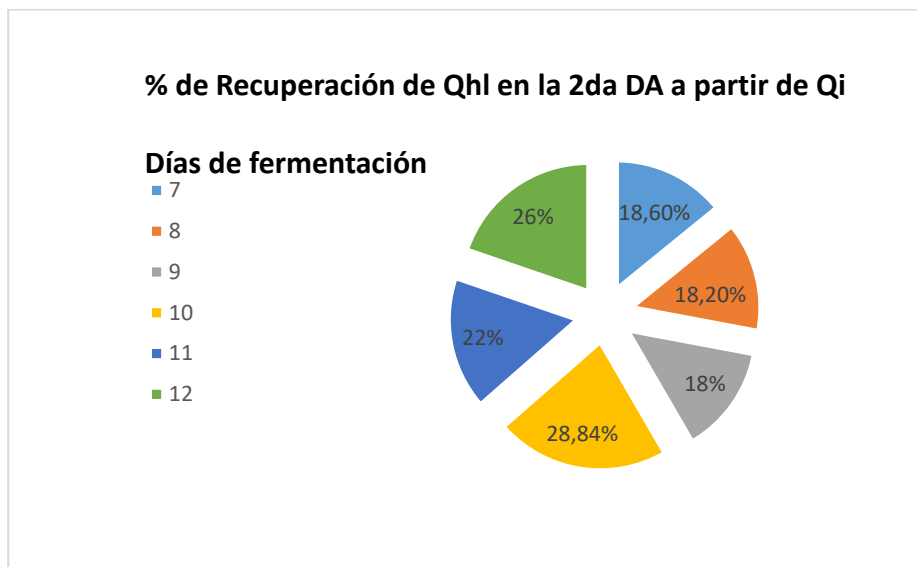
*Figura 4.4 Fotografía del quitosano obtenido a partir de cáscara de langostino por fermentación láctica*

Los rendimientos obtenidos se muestran en la *Tabla 4.6*. La reacción de desacetilación se realizó 2 veces, lavando el sólido hasta neutralidad y secándolo entre una y otra.

Tabla 4.6 Masas obtenidas y rendimientos de DA en la obtención de Qhl

Tiempo de fermentación (días)	Masa inicial (g)	Masa final 1ra DA (g)	Masa final 2da DA (g)	%R 1ra DA	%R 2da DA
7	5,00	1,27	0,93	25,4	18,6
8	5,01	1,42	0,91	28,5	18,2
9	5,11	1,63	0,92	32,1	18,0
10	5,34	2,62	1,54	49,0	28,8
11	5,02	2,51	1,14	50,0	22,0
12	6,81	2,91	1,77	43,0	26,0

En la *Figura 4.5* se grafican en forma comparativa los porcentajes de recuperación de Qhl a partir de Qi obtenida en distintos tiempos de fermentación.



*Figura 4.5* Porcentajes de rendimientos gravimétricos de la 2da DA de Qhl a partir de Qi obtenida con diferentes días de fermentación

Este gráfico permite observar rápidamente que la obtención de Qhl a partir de Qi obtenida por fermentación de 10 días arroja un buen valor de rendimiento sin extenderse muchos días en la fermentación y por tanto fueron las condiciones y método seleccionados para obtención de Qi y Qhl en adelante.

Uno de los mayores problemas relacionados a la obtención de quitosano, manteniendo la estructura lo más cerca posible a la forma nativa, es minimizar la desacetilación parcial y la degradación de la cadena, causada por la desmineralización y desproteización realizada durante el tratamiento a la materia prima (cáscaras de langostino), por esta razón es que se consideró apropiado trabajar en condiciones menos severas (método enzimático), minimizando el tiempo lo máximo posible pero atendiendo el rendimiento final. Los diferentes métodos de extracción de Qi y posterior desacetilación para obtener quitosano, son influenciados por diferentes factores introducidos en cada etapa de la preparación. Además de los factores relacionados con la desacetilación, influyen también en las características finales del quitosano obtenido, la estructura física de la Qi original y el proceso de aislamiento. También depende fuertemente de la materia prima de partida y de las variables de la técnica implementada: tiempo de reacción, pH y agitación, entre otras. (Flores et al. 2012)

De acuerdo a los resultados obtenidos y, teniendo en cuenta la discusión previa, se continuó trabajando con la muestra de 10 días de fermentación para las determinaciones de PM, DD y preparación de *films*.

#### **4.5.3 Caracterización del quitosano de langostino**

##### **4.5.3.1 Espectroscopía Infrarroja**

En la *Figura 4.6* se observan los espectros FTIR obtenidos del Qhc y Qhl obtenido por fermentación láctica de 10 días. También se agregó un espectro de Qi extraído de literatura para observar los cambios luego de la desacetilación. (E. Khor. 2001)

El espectro de Qi extraído de bibliografía muestra las bandas características de la misma, como la banda de tensión para el carbonilo de la amida presente en un doblete a 1626 y 1661  $\text{cm}^{-1}$ , las bandas de las amidas II y III a 1558 y 1318  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas de tensión para los grupos N-H, O-H y C-H a 3269, 3436 y 2925  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente. (Duarte. M. 2002)

El patrón de bandas observado para el Qhl es característico de la estructura correspondiente a quitosano, de acuerdo a la bibliografía. (Huerta. A. et.al. 2012) Las bandas encontradas revelan la presencia de los grupos hidroxilos que se observan como

una banda ancha ubicada en  $3450\text{ cm}^{-1}$  en el caso del Qhc y  $3447\text{ cm}^{-1}$  para el Qhl, acorde con lo reportado en la literatura, siendo esta banda más pronunciada en la muestra de quitina que en el quitosano. (Peniche. C. 2006) Las diferencias pueden deberse a residuos de agua en la muestra.

La banda a  $2880\text{ cm}^{-1}$  en el Qhl y  $2888\text{ cm}^{-1}$  en el Qhc corresponde a una vibración tensión del enlace C–H. También se aprecia una banda de amida I, que en Qhc y Qhl se encuentra a  $1650\text{ cm}^{-1}$ , (Esta banda en la Qi se encuentra a  $1630\text{ cm}^{-1}$ ), resultado acorde con los reportes hechos por Brugnerotto (Brugnerotto. J. et.al. 2001) y Peniche (Peniche. C. 2006) quienes además proponen utilizar estas bandas de vibración del grupo amida como base para determinar el grado de desacetilación de la quitina en el espectro infrarrojo. Se observan también en el espectro del Qhl, bandas de intensidad media a débil para el enlace C-N de aminas alifáticas primarias, que aparecen en la región entre  $1250$  y  $1020\text{ cm}^{-1}$  y la vibración de deformación del enlace C-O entre  $1030$ - $1155\text{ cm}^{-1}$ . (Matsumoto. T. et.al. 1993)

La desacetilación se evidencia por la desaparición o disminución de las bandas características de vibraciones de estiramiento del grupo metil presente en el grupo acetamido ( $\text{R-NHCOCH}_3$ ) La desaparición o disminución de la banda a  $1350\text{ cm}^{-1}$  asignada a vibraciones del grupo amido- $\text{CH}_3$ .

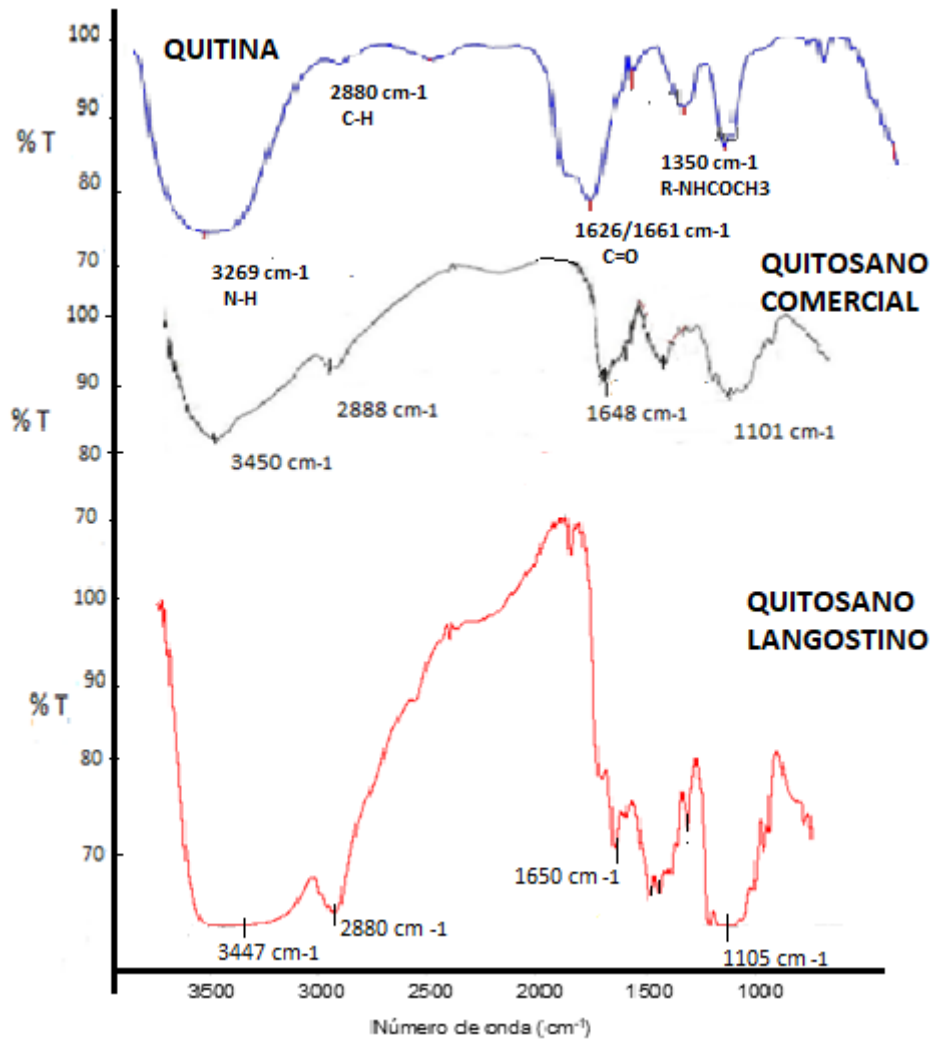


Figura 4.6 Espectros FTIR de la quitina (Qi), quitosano comercial (Qhc) y quitosano extraído de cáscara de langostino por fermentación láctica (Qhl)

#### 4.5.3.2 Peso Molecular Viscosimétrico (Mv)

Se determinó el Mv del Qhl obtenido por fermentación láctica aplicando la ecuación de Mark – Houwink – Sakurada. Inicialmente se determinó la constante B del viscosímetro, para lo cual se calibró el instrumento con una solución de HAc 0,1M y NaCl 0,2M, aplicando la Ecuación 3.7, descrita en el capítulo 3, apartado 3.5.4. La constante B del viscosímetro fue de  $2,22 \times 10^{-6} \text{ mL}\cdot\text{s}^{-2}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

En la Tabla 4.7 se muestran los resultados obtenidos para  $\eta$ ,  $\delta$  y  $\eta_{sp}/c$  para cada solución del polímero.

Tabla 4.7 Valores obtenidos en la determinación de Mv del quitosano de langostino

C (g.mL <sup>-1</sup> )	$\delta$ (g.mL <sup>-1</sup> )	t (s)	n (poise)	nsp/c (mL.g <sup>-1</sup> )
0	1,0032	4,74	1,052.10 <sup>-5</sup>	
0,001	1,033	6,76	1,54.10 <sup>-5</sup>	4,68.10 <sup>+2</sup>
0,003	1,034	11,73	2,68.10 <sup>-5</sup>	5,16. 10 <sup>+2</sup>
0,005	1,0345	22,83	5,22.10 <sup>-5</sup>	7,93. 10 <sup>+2</sup>
0,007	1,035	39,91	9,13.10 <sup>-5</sup>	1,10.10 <sup>+3</sup>
0,009	1,036	49,54	11,34.10 <sup>-5</sup>	1,09. 10 <sup>+3</sup>
0,01	1,037	73,8	16,91.10 <sup>-5</sup>	1,51. 10 <sup>+3</sup>

La viscosidad intrínseca  $[\eta]$  del polímero se determinó extrapolando a concentración cero la gráfica de viscosidad específica,  $\eta_{sp}/c$ , en función de la concentración en masa de las soluciones (Figura 4.7). Este valor se reemplazó en la ecuación de Mark – Houwink – Sakurada (Ecuación 3.7), para calcular el peso molecular del polímero, donde la constante K y  $a$  son  $1,81 \times 10^{-3}$  y 0,93 respectivamente, en las condiciones empleadas. (Kassai. 2007) En la Tabla 4.8 se resumen los parámetros y resultados correspondientes a la determinación del Mv del Qhl.

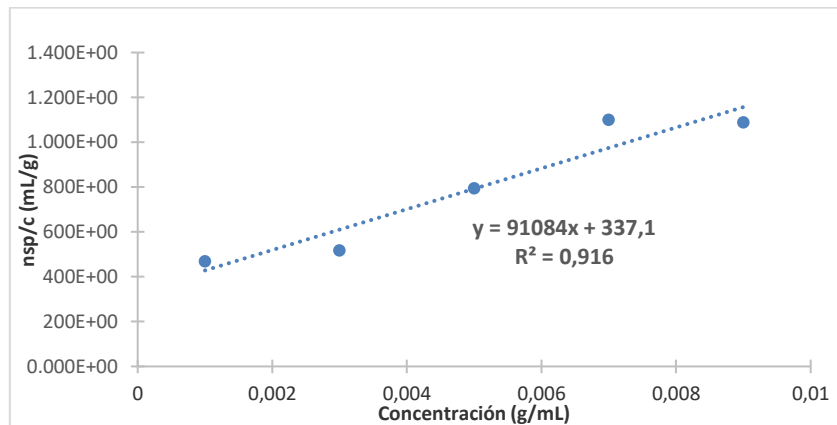
Figura 4.7 Gráfico de  $\eta_{sp}/c$  en función de la concentración (g/mL)

Tabla 4.8 Parámetros y resultado correspondientes a la determinación del Mv de Qhl

[ $\eta$ ]	337,1
K'	$1,81 \cdot 10^{-3}$
$\alpha$	0,93
Mv	$4,64 \cdot 10^5$ g/mol
<hr/>	

El quitosano se puede clasificar de acuerdo a su peso molecular en alto, medio y bajo. El rango para quitosano de alto peso molecular es superior a  $10^6$  g.mol<sup>-1</sup>. El valor obtenido para el Qhl en esta tesis fue de  $4,64 \times 10^5$  g.mol<sup>-1</sup>, el cual lo clasifica como de peso molar medio. Otros autores obtuvieron valores similares para el Qhl (de langostino *Pleoticus muelleri argentine* y cangrejo *Ovalipes trimaculatus*, provenientes de Chubut, Argentina), valores de peso molecular de  $2,39 \times 10^5$  y  $3,1 \times 10^5$  g.mol<sup>-1</sup> respectivamente. (Dima. et al. 2013) Para quitosano a partir de cáscara de camarón, *Penaeus vannamei*, proveniente de Quito, Ecuador, se obtuvo un peso molecular promedio de  $4,40 \times 10^5$  g.mol<sup>-1</sup>. (Rivera Toapanta. 2013), Otro autor obtuvo para quitosano a partir de la cáscara de camarón, *Litopenaeus vannamei*, proveniente de Lima, Perú, un peso molecular promedio de  $5,54 \times 10^5$  g.mol<sup>-1</sup>. (Mendoza Balvín. E. et al. 2006) La variación en los pesos moleculares se encuentran influenciadas por las condiciones del proceso de desacetilación, por ejemplo, si se controlan los niveles de oxígeno y se mantienen bajos durante la reacción, se promueve la obtención de quitosanos con un mayor peso molecular y elevado grado de desacetilación (Zhang et al. 2000). Algunos autores recomiendan el uso de reactores cerrados y la adición de NaBH<sub>4</sub> (borohidrato de sodio) para que este reactivo reaccione con el oxígeno e impida la oxidación y consecuente degradación del biopolímero (Ottey et al. 1996; Zhang et al. 2000). Otro factor a considerar, es el tiempo de reacción, ya que este afecta significativamente al peso molecular del quitosano; sin embargo, gracias a la estabilidad de los enlaces trans propios de la estructura de la quitina, es indispensable realizar el proceso de desacetilación por tiempos prolongados para que el medio alcalino, junto con altas temperaturas, actúe en el rompimiento de los grupos COCH<sub>3</sub> (Chandumpai et al. 2004)

El Mv del Qhc determinado por esta metodología arrojó un valor de:  $2,62 \times 10^4$  g.mol<sup>-1</sup>.

#### 4.5.3.3 Grado de Desacetilación (GD)

Finalmente, se determinó el GD por titulación potenciométrica para Qhc y Qhl obtenido por desacetilación de la Qi obtenida con 10 días de fermentación. Se realizó una curva de titulación con dos puntos de inflexión cuyos valores se determinaron según el criterio de la primera derivada. La diferencia entre los dos puntos de inflexión en la curva de titulación corresponde a la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del quitosano. (Figura 4.8 a y b) El grado de desacetilación obtenido para Qhl fue de 78,4%, algo menor que el correspondiente para Qhc, que fue de 81,3%. Usualmente, en el caso del quitosano de uso comercial, se establece que el grado de desacetilación se encuentre comprendido entre el 60 y 95%. (Dima. et al. 2013).

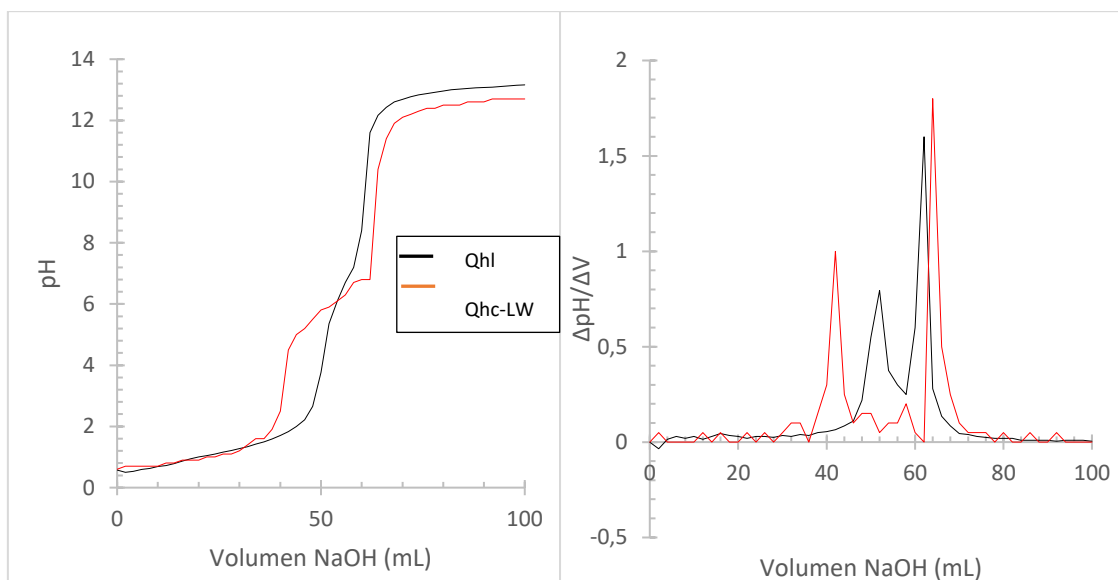


Figura 4.8 a) Curvas de titulación del quitosano comercial y del obtenido de langostino

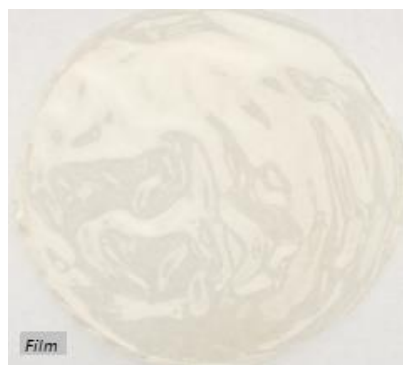
b) Primera Derivada

Ciertos autores (Brugnerotto. J. et al. 2001, Peniche. C. 2006, y Sugimoto. M. et al. 1998), describen que la técnica de espectroscopía infrarroja permite determinar el grado de desacetilación mediante la correlación de algunas bandas de vibración. Ellos plantean, por ejemplo, que el grado de desacetilación en una muestra de quitosano está asociado con el progresivo debilitamiento de las bandas correspondientes a los grupos NH ( $3269\text{ cm}^{-1}$ ), los enlaces N–H de la amida secundaria ( $1561\text{ cm}^{-1}$ ), la banda de la amida terciaria

( $1381\text{ cm}^{-1}$ ) y los enlaces C=O de la amida primaria ( $1630\text{ cm}^{-1}$ ). La banda de absorción del grupo amida primaria prevalece sobre los grupos de amida secundaria, por la pérdida del grupo acetilo de los grupos amida del carbono 2, dando lugar a un grupo amino en esa posición, ya que los grupos acetilo se hidrolizan en medio básico, convirtiendo la quitina en quitosano, tal como lo reportara Khor. (Khor. E. 2001)

#### 4.5.4 Preparación de *films*

Los *films* obtenidos de Qhl presentaron un aspecto homogéneo, fueron transparentes, levemente amarillentos y con un espesor de aproximadamente  $50\text{ }\mu\text{m}$ . En la *Figura 4.9* se muestra una fotografía de un *film* del Qhl obtenido. Una vez secos, fueron retirados de la placa con facilidad para su caracterización.



*Figura 4.9 Film de quitosano obtenido a partir de cáscara de langostino*

#### 4.5.4.1 Caracterización de los *films*

##### 4.5.4.1.1 Espectroscopia FTIR

En la *Figura 4.10* se muestran los espectros infrarrojos de los *films* de Qhc y Qhl. Se comprobó que el *film* de Qhl presenta un patrón de señales semejante al observado para el *film* de Qhc, estas son las vibraciones de estiramiento de N-H y O-H a  $3457\text{ cm}^{-1}$ , la banda de absorción correspondiente al stretching C-H a  $2778\text{ cm}^{-1}$  y las bandas de absorción debida a vibraciones de deformación del grupo amino a una frecuencia de  $1586$  y  $1523\text{ cm}^{-1}$ . Bandas de absorción de intensidad media a débil para el enlace C-N de las aminas alifáticas primarias aparecen en la región de  $1250$  a  $1020\text{ cm}^{-1}$ .

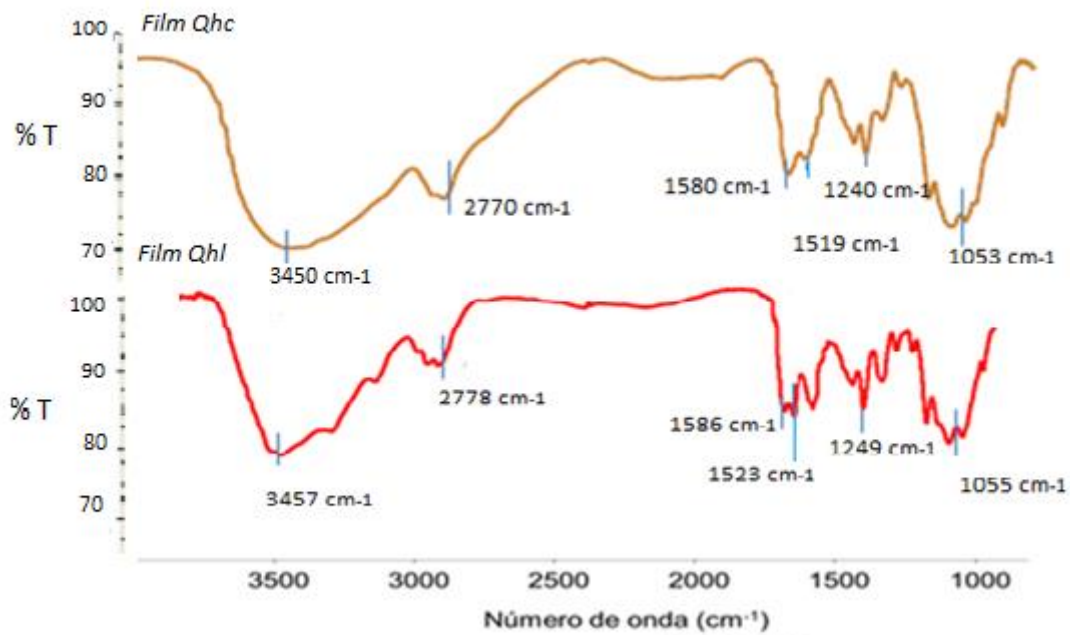


Figura 4.10 Espectro FTIR de los films preparados

#### 4.5.4.1.2 Índice de Hinchamiento de los films

Se determinó el IH de los *films*, de acuerdo a la *Ecuación 3.3*, descrita en el capítulo 3, apartado 3.5.3.2; en soluciones buffers a pH 4,0 y 7,0, a temperatura ambiente. Los valores de IH se muestran en la *Figura 4.11*. El *film* de Qhl a pH 4 alcanza un valor de hinchamiento máximo de aproximadamente un 600%, mientras que a pH 7 este valor es cercano a un 700%. El *film* de Qhc, a pH 4, posee un valor mayor de alrededor de 1000 % y a pH 7 de un 800%.

A pH 4, los valores de IH son elevados, esto puede explicarse debido a que la mayoría de los grupos  $\text{NH}_2$  están protonados, lo que ocasiona mayor repulsión electrostática y la consecuente separación de las cadenas del polímero.

Las diferencias entre ambos quitosanos podrían deberse a la variación en los PM de ambos quitosanos y a una mayor pureza del Qhc. Tanto los *films* de Qhc como de Qhl son estables a ambos valores de pH.

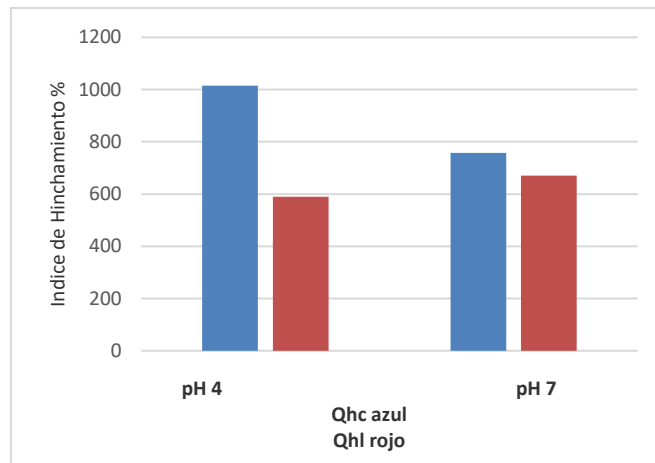


Figura 4.11 Índice de Hinchamiento (%) de films de Qhc y Qhl a diferentes pH.

#### 4.5.4.1.3 Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de los films

En la *Tabla 4.9* se muestran los resultados obtenidos. El *film* de Qhl tuvo un WVP calculado, según la *Ecuación 3.2* (descrita en el capítulo 3, apartado 3.5.3.1), de  $1,70 \pm 5 \times 10^{-12}$  ( $\text{gm}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$ ). El valor obtenido para Qhl fue menor que para Qhc concordando con el valor de GD obtenido para ambos. Esto muestra que la cantidad de grupos amino libres en el Qhc es mayor. Estos grupos tienen capacidad de formar uniones puente hidrógeno, aumentan la solubilidad y por lo tanto la difusión de vapor de agua a través de la matriz polimérica obtenida. Otro factor que podría influir también es la diferencia en el peso molecular de ambos quitosanos.

Tabla 4.9 Valores de permeabilidad al vapor de agua de films de Qhc y Qhl

Muestra	WVP ( $\text{gm}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$ )
Qhc	$510 \times 10^{-12} \pm 5$
Qhl	$170 \times 10^{-12} \pm 5$

Estos resultados nos permiten decir que sería posible controlar la permeabilidad de un material polimérico variando la cantidad de grupos funcionales hidrofílicos presentes en la red. La permeabilidad al vapor de agua resulta útil para entender el posible mecanismo

de transferencia de masa y las interacciones poliméricas en los *films*; y puede ser definida como un producto de la difusión y solubilidad del material (Aldana. et al. 2013). Los materiales con valores similares son considerados semi-permeables, los cuales pueden ser utilizados en diferentes aplicaciones biomédicas como por ejemplo apósitos para heridas. En particular, la permeabilidad al vapor de agua de un *film* utilizado como apósito en biomedicina, debería prevenir tanto la deshidratación excesiva, como la acumulación de exudado. (Valencia-Gómez. L. et al. 2016)

#### **4.6 Conclusiones parciales**

La metodología utilizada permitió obtener quitosano a partir de quitina (Qi) extraída de residuos de langostino (Qhl), desechados en las costas patagónicas del Golfo San Jorge, con buen rendimiento y en tiempos cortos de reacción. Los resultados obtenidos permiten afirmar que el Qhl, posee características estructurales (FTIR) y comportamiento comparable al Qhc (quitosano comercial).

Se obtuvieron rendimientos comparables con ambas metodologías, químicas y enzimáticas. Esto permitió seleccionar la metodología enzimática considerando sus ventajas desde el punto de vista de la sustentabilidad del medio ambiente.

Los *films* preparados con Qhl, presentaron un perfil de bandas de infrarrojo comparables a los obtenidos a partir de Qhc y las diferencias en el índice de hinchamiento y permeabilidad demostrarían la presencia de una menor cantidad de grupos amino libres para el Qhl, en acuerdo con las determinaciones de GD por titulación de grupos amino libres.

Los resultados obtenidos en esta etapa son alentadores desde el punto de vista de la sustentabilidad y el cuidado del medio ambiente, ya que se ha demostrado que es factible obtener un material a partir de desechos, con características físico-químicas semejantes al producto comercial. En la propuesta desarrollada se reducen los desechos de ácido y álcali utilizados en los métodos de extracción químicos. El trabajo generaría un impacto socio-económico importante para el área del Golfo San Jorge de la Patagonia, ya que se reutiliza un desecho de la industria pesquera para obtener el polímero y un subproducto de la industria láctea como reactivo.

## 4.7 Bibliografía

Aider. M, Halleux. D. et al. 2009. Skim Acidic Milk whey Cryoconcentration and Assessment of its Functional Properties: Impact of Processing Conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologie*. 10(3): 334-341.

Aldana. A. et al. 2013. Nanomodification of Chitosan Microspheres with Dendron Molecules. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*. 3(1):157-163.

Altman. A, y Gupta. V. 2010. Adhesion, migration and mechanics of human adipose-tissue-derived stem cells on silk fibroin–chitosan matrix. *Acta Biomaterialia*. 6: 1388.

Avila. A, Strumia. M et al. 2007. Obtención de quitina y quitosano a partir de caparzones de langostinos y centollas. *Naturalia patagónica*: 3(2): 1-8.

Ávila Sanabria. A. 2010. Preparación de materiales biocompuestos a partir de quitosano. Estudios de aplicación. Tesis doctoral. UNPSJB.

Briceño. J, de Montiel. N. 2008. Recuperación de quitina a partir de los residuos sólidos generados del procesamiento industrial de crustáceos. *Revista Cubana de Química*. 20(3): 17-26.

Brugnerotto. J, Lizardib. J. et.al. 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42, 3569-3580.

Caprile. M. 2005. Obtención y utilización de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos. *International Solid Waste Association. Hacia un sistema integral de gestión de residuos sólidos urbanos*. Copenhagen, ISWA, 1-6.

Castro. N. 2011. A New Challenge *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*. *Green Chemistry*. 21(2): 169-182.

Chandumpai. A. et al. 2004. Preparation and physico-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the squid species, *Loligo lessoniana* and *Loligo formosana*. *Carbohydrate Polymers*. 58: 467-474.

Colina. M, Ayala. A. et al. 2014. Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangrejos. Escala piloto e industrial. *Revista Iberoamericana de polímeros*. 15(1): 21-43.

Curbelo Hernández. C, Núñez Sánchez. A. et al. 2018. Despigmentación de residuos de camarón con ozono. *Centro Azúcar*. 45(4): 51-63.

Dash. M, Chiellini. F. et al. 2011. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in polymer science*. 36(8): 981-1014.

Dima. J, Sequeiros. C. et al. 2013. Optimización de la obtención de quitosano de crustáceos patagónicos (Puerto Madryn, Chubut): Desarrollo de micropartículas y evaluación de su acción bactericida en patógenos de usual frecuencia en maricultura. *Revista de Asociación Argentina de Ingeniería Química*. 1-19.

Escobar. D, Quintana. M et al. 2014. Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. *Scientia y Technia*. 18(1): 260-266.

Escobedo. G. 1994. Obtención de quitina por métodos enzimáticos a partir de cefalotórax de camarón. Doctoral dissertation. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, DF, México.

Fernández et al. 2013. Evaluación viscosimétrica del quitosano derivado de la quitina de langosta. *Rev. Iberoam. Polim*. 14(2): 84-91.

Flores. A, Arias. L. et al. 2012. Chitin and L (+)-lactic acid production from crab (*Callinectes bellicosus*) wastes by fermentation of *Lactobacillus* sp. B2 using sugar cane molasses as carbon source. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 35(2):1193- 1200.

Hidalgo. C, Fernández. M. et al. 2009. Estudio de quitosanos cubanos derivados de la Quitina de la langosta. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 10(1): 11-27.

Huerta. A. C, Rincón. M. C. et al. 2012. Obtención y caracterización de películas de quitosano elaborado a partir de los desechos de la industria cangrejera. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13(3), 77-88.

Jelen. P. et al. 2011. Whey processing. Utilization and Products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. p: 731-737.

Kassai. M. 2007. Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscosimetric constants for chitosan in any solven-temperature system usin experimental report viscosimetric constants data. *Carbohydr. Polym*. 47(1): 477 - 488.

Khor. E. 2001. Chitin: fulfilling a biomaterials promise. Elsevier. p. 136.

- Kurita. K. 2006. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine biotechnology*. 8(3): 203-226.
- López. A. 2012. Obtención de derivados de almidón y quitosano a partir de materias primas y desechos sólidos industriales. Tesis Doctoral. Facultad Experimental de Ciencias. Departamento de Química. Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.
- Macneil. S. 2008. Biomaterials for tissue engineering of skin. *Mater. Today*. 11: 26.
- Majeti. N y Ravi. K. 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*. 46: 1.
- Marcia. E, Malespín. J. et al. 2011. Estudio de la fermentación láctica para la extracción de quitina a partir de desechos de crustáceos. *Nexo Revista Científica*. 24(1): 33-42.
- Mármol. Z, Páez. G. et al. 2011. Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*. 1: 53-58.
- Mármol. Z. et, al.2006. Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón. *Multiciencias*. 4(2):1-10.
- Mathur. N, Narang. C. 1990. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal of Chemical Education*. 67(11): 938.
- Matsumoto. T, Kawai. M. et al. 1993. Rheological properties and fractal structure of concentrated polyion complexes of chitosan and alginate. *Biorheology*. 30(5-6): 435-441.
- Mendoza Balvín. E, Jauregui Nongrados. J. 2006. Extracción de quitina a partir del langostino (*Penaeus brevirostris*) para la obtención de quitosano y su aplicación en la adsorción de iones de plata.
- Mengatto. L. N. 2010. *Administración de fármacos por vía transdérmica* (Doctoral dissertation).
- Methacanon. P, Prasitsilp. M. et al. 2003. Heterogeneous N-Deacetylation of Squid Chitin in Alkaline Solution. *Carbohydrate polymer*. 52:119-123.
- Mourya. V, Inamdar. N. et al. 2008. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore, *React. Funct. Polym.* 68: 1013.
- Ottey. M. et al. 1996. Compositional heterogeneity of heterogeneously deacetylated chitosans. *Carbohydrate Polymers*. 29: 17-24.

- Pacheco Lopez. N. 2010. Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: caracterización y aplicación. Food and Nutrition. Universite Claude Bernard - Lyon I, 2010. Español. <NNT: 2010LYO10054>. <tel-00807945>
- Parada. L, Crespín. G. et al. 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. Revista Iberoamericana de Polímeros. 5(1): 1-16.
- Peniche. C. 2006. “Estudios sobre quitina y quitosana”. Ph.D. Disertación, Universidad de la Habana, La HabanaCuba. 89p
- Percot. A, Viton. C. et al. 2003. Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Shells. Biomacromolecules. 4:12-18.
- Prashanth. K y Tharanathan. R. 2007. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. Trends in food science & technology. 18(3): 117-131.
- Rivera Toapanta. E. 2013. Evaluación de la capacidad de esferificación de quitosano como sustituto de alginato en la elaboración del falso caviar.
- Roberts. G. 1992. Structure of chitin and chitosan. Chitin chemistry. Palgrave, London. p. 1-53.
- Sugimoto. M, Morimoto, M, et al. 1998. Preparation and characterization of water-soluble chitin and chitosan derivatives. Carbohydrate polymers, 36(1), 49-59.
- Valencia-Gómez. L. et al. 2016. Apósitos de polímeros naturales para regeneración de piel. Revista mexicana de Ingeniería Biomédica, 37(3): 235-249.
- Wang. Q, Chen. X. et al. 2006. Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. Carbohydrate Polymers. 65:194.
- Zhang. Y. et al. 2005. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. Carbohydrate Research. 340: 1914-1917.

## Capítulo 5 - Síntesis y caracterización de soportes poliméricos de quitosano con otros polímeros naturales y semisintéticos

### 5.1 Objetivo

Preparar *films* de quitosano comercial y de langostino, con gelatina comercial y otros polímeros semisintéticos. Caracterizarlos y comparar sus propiedades.

### 5.2 Introducción

La aplicación comercial de los biopolímeros se ha visto limitada debido a que, en general, son frágiles, hidrofílicos y tienen baja resistencia térmica. Por otro lado, presentan la gran ventaja de ser biodegradables. En contraste, los polímeros sintéticos o derivados de recursos no renovables, generalmente son de menor costo y de limitada o mínima biodegradabilidad, pero presentan buenas características mecánicas y térmicas. La obtención de materiales formados por la combinación de polímeros naturales y sintéticos, es de gran interés, porque en ellos se combinan las ventajas de los polímeros de origen natural, como así también las ya conocidas de los polímeros sintéticos. Por lo tanto, estos materiales, pueden ser diagramados con nuevas propiedades e interesantes usos.

Las mezclas de polímeros alifáticos y polisacáridos son las más usadas en aplicaciones de ingeniería de tejidos biológicos, liberación controlada de medicamentos y en la industria de empaques. (Sepúlveda. L. et.al. 2016)

Mediante la combinación de polímeros con otros componentes pueden lograrse productos finales con nuevas propiedades, que ninguno de sus componentes individualmente posee. El mezclado de polímeros es uno de los métodos más fáciles y de bajo costo para el desarrollo de nuevos materiales poliméricos comerciales. Las propiedades de las mezclas obtenidas pueden ser manipuladas de acuerdo con la correcta selección de la proporción y componentes poliméricos empleados. (Jyotishkumar. P. et al. 2015)

Se han reportado trabajos en los que se combina física o químicamente el Qhc con otros componentes, como polialcoholes, otros hidratos de carbono, polímeros naturales o sintéticos, para mejorar las propiedades mecánicas, hidrofóbicas, térmicas de las películas, entre otras.

Un ejemplo es el entrecruzamiento de quitosano con otros polímeros o moléculas pequeñas para aumentar la solubilidad de este en solventes acuosos, aumentar su resistencia a la degradación química o biológica y ayudar a controlar la liberación de principios activos desde la matriz formada. (Mourya. V. et al. 2008) Existen varios agentes entrecruzantes que han sido estudiados para tal fin, como por ejemplo la epíclorhidrina y el etilenglicol glicidil éter. Pero quizás la reacción de entrecruzamiento más frecuentemente utilizada para este fin, es la reacción con dialdehidos para formar uniones químicas tipo base de Schiff. (Velazquez. C. 2003)

El entrecruzamiento se produce cuando hay más de dos lugares reactivos en uno de los monómeros y así el polímero formado puede crecer en forma de red con enlaces transversales. Debido a la estructura única de la macromolécula combinada con su polifuncionalidad, el quitosano tiene la capacidad de formar geles. La reticulación (o entrecruzamiento) se produce cuando un reactivo (un agente entrecruzante) introduce puentes intermoleculares y/o enlaces cruzados entre las macromoléculas del polisacárido. El agente entrecruzante puede reaccionar con macromoléculas de cadena lineal o ramificadas (reticulación/entrecruzamiento) y/o consigo mismo (polimerización), dependiendo de la naturaleza del agente entrecruzante y las condiciones de reacción. Cuando el grado de entrecruzamiento es alto, el material es poco cristalino. (Oak. M. et al. 2012)

Los materiales entrecruzados poseen varias características, propiedades y ventajas. Son fáciles de preparar con reactivos relativamente económicos y disponibles en una variedad de estructuras, con distintas propiedades y también en numerosas configuraciones, por ejemplo, geles, partículas, membranas, revestimientos, películas, fibras, cápsulas y esponjas. Son insolubles en medios ácidos y alcalinos, así como en disolventes orgánicos. Se vuelven más resistentes al corte, a altas y bajas temperaturas y pH, en comparación con los polisacáridos primarios. (Pella. M. et al. 2018)

Los polímeros entrecruzados de quitosano muestran mejores resultados en términos biológicos y mecánicos, cuando se compara con el quitosano. (Huerta. A. et al. 2018)

La gelatina (GE) es un polímero derivado del colágeno ampliamente utilizado en películas para la reconstrucción de tejidos y es por ello, que se estudia su comportamiento frente a diferentes moléculas bioactivas. Sin embargo, se ha demostrado que los *films* de gelatina pura son frágiles, hidrofílicos y fácilmente atacados por bacterias. (Huang. Y. et al. 2008) La naturaleza altamente higroscópica de la GE es su principal inconveniente, al considerar el uso de películas como barreras de protección, ya que tienden a hincharse o disolverse al entrar en contacto con superficies con alto contenido de humedad. En consecuencia, la tendencia actual en el diseño de materiales biodegradables a base de GE para aplicaciones biomédicas, se centra en el desarrollo de *films* con mejores propiedades de resistencia mecánica y al agua, mediante la combinación de GE con biopolímeros como el quitosano.

Por lo antes expuesto es que en esta tesis se planteó estudiar el agregado de otros componentes a los *films* de quitosano-gelatina y evaluar sus propiedades. Se trabajó con polivinilpirrolidona (PVP), genipín (Gen) y sorbitol (Sor).

La polivinilpirrolidona es un polímero soluble en agua que se obtiene a partir del monómero N-vinilpirrolidona. La molécula de PVP contiene un componente hidrofílico (la porción polipirrolidona) y un grupo hidrofóbico (el grupo alquilo). (Marín Silva. D. et al. 2017) Se utiliza como plastificante de películas para mejorar sus propiedades mecánicas y de transporte.

El genipín es un reactivo natural (compuesto de naturaleza iridoide) extraído de la flor de jazmín, y surge como una alternativa a los agentes entrecruzantes convencionales empleados para el quitosano, debido a su buena biocompatibilidad y ausencia de toxicidad. (Butler. M. et al. 2003)

El sorbitol (poliol derivado de la glucosa) es un agente plastificante de películas que se adiciona buscando una disminución de la fragilidad y aumento de la elasticidad de las mismas. (Casariego. A. et al. 2002)

## 5.3 Parte Experimental

### 5.3.1 Síntesis y caracterización de *films* de quitosano con diferentes compuestos

La metodología utilizada para obtener todos los *films* fue la de *cold-casting*.

**5.3.1.1 *Films* de Gelatina tipo A (GEA):** se prepararon soluciones de concentración 5 % p/v. Para esto se pesaron 2,5 g de GEA y se agregaron 50 mL de agua destilada, se dejó durante 24 h en agitador magnético a 40° C, tapado. Luego de este tiempo se volcaron 6 mL de la solución sobre una placa de Petri. Se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 a 48 h, para su posterior utilización.

**5.3.1.2 *Films* de Qhc-GEA- Ce<sup>+3</sup> y Qhl-GEA-Ce<sup>+3</sup>:** se prepararon soluciones al 2% p/v de Qhc y de Qhl, en HAc al 5% v/v y se homogeneizaron por 24 h a 40°C. Por otro lado, se prepararon soluciones de GEA al 5% p/v en agua destilada y se homogeneizaron de la misma forma por 24 h. Para preparar los *blends* se mezclaron 0,95 mL de cada solución de Qhc o de Qhl con 5 mL de GEA. Se agregó como antifúngico 0,0125 g de nitrato de Ce<sup>+3</sup>. Se homogeneizaron cada una de las soluciones en agitador magnético a 40°C por 5 minutos. Luego de este tiempo se volcó la solución sobre una placa de Petri. Se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 a 48 h, para su posterior utilización.

### 5.3.2 Agregado de plastificantes y entrecruzantes

Se preparó una solución acuosa de PVP al 1% m/m, una solución acuosa de Sor al 2% m/m y una solución acuosa de Gen al 0,5% m/v.

Se prepararon mezclas de soluciones de Qhc y Qhl, con GEA, combinados con las soluciones PVP, Sor o Gen, en la proporción 70% (Qhc o Qhl) / 20% (GEA) / 10 % (componente agregado) V/V. Se agregó nitrato de cerio (0,0125 g por *film*) como antifúngico. Las mezclas se mantuvieron con agitación durante 8 h a 38°C y a continuación se volcaron en placas de Petri de 6 mm de diámetro para obtener los *films* correspondientes. Se dejaron secar a temperatura ambiente 48 h. Cada uno de los *films* se removió cuidadosamente de las cápsulas y se almacenaron a temperatura y humedad ambiente. Se caracterizaron mediante FTIR, previo secado al vacío hasta peso constante. Los *films* se prepararon por duplicado.

### 5.3.2.1 Variación de la concentración de Gen

El Gen fue agregado a la mezcla de acuerdo a las siguientes proporciones:

Qhc 70% - GEA 20% - Gen 10% -  $Ce^{+3}$

Qhc 65% - GEA 20% - Gen 15% -  $Ce^{+3}$

Qhc 60% - GEA 20% - Gen 20% -  $Ce^{+3}$

La preparación se realizó siguiendo los mismos detalles experimentales que para los *films* anteriores.

## 5.4 Resultados y Discusión

### 5.4.1 *Films* de gelatina tipo A (GEA) - Qhc-GEA- $Ce^{+3}$ y Qhl-GEA- $Ce^{+3}$ :

Los *films* de Qhc/GEA, Qhl/GEA, Qhl/GEA/ $Ce^{+3}$  y Qhc/GEA/ $Ce^{+3}$  fueron uniformes, homogéneos y delgados. (Figura 5.1) Presentaron una buena flexibilidad, siendo retirados con facilidad de la placa de polipropileno. Los *films* de GEA presentaron espesores que van desde 80 a 115  $\mu m$  y a las 48 h desarrollaron hongos sobre su superficie. Los *films* de las mezclas, Qhl-GEA- $Ce^{+3}$  y Qhc-GEA- $Ce^{+3}$ , tuvieron espesores que variaron de 105 a 130  $\mu m$ .

El espesor de los *films* depende del método utilizado para su fabricación, de la concentración y la composición de los polímeros utilizados. (Rangel-Marrón. M. et al. 2013) En el caso particular de los *films* en base a GEA y Qhc, se ha observado que su espesor depende de la concentración de Qhc. (Jridi. M. et al. 2014)

Visualmente, los *films* de GEA y las mezclas Qhl-GEA- $Ce^{+3}$  y Qhc-GEA- $Ce^{+3}$  fueron transparentes, mientras que los *films* de Qhl solo, eran levemente amarillentos. La transparencia es una propiedad de gran interés en el estudio de materiales con utilidad en biomedicina, debido a su gran impacto sobre la apariencia del producto cuando se utiliza sobre la piel. (Nowzari. F. et al. 2013)

Los *films* de Qhc, Qhl y los de Qh/GEA con agregado de  $Ce^{+3}$  no desarrollaron hongos sobre su superficie. Algunos autores han demostrado que el agregado de  $Ce^{+3}$  a un

biopolímero le confiere actividad antibacteriana y antifúngica. (Huang. C. et al. 2010) Está demostrada la eficacia de  $Ce^{+3}$  en el tratamiento de quemaduras y actividad inmunomoduladora entre otras. Algunos estudios han demostrado su efecto microbicida contra bacterias y levaduras incluso a concentraciones muy bajas. (Al-Dwairi. Z. et al. 2012) En estudios donde se evaluó la actividad antimicrobiana del nitrato de cerio, en catéteres de quitosano, contra *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* y *Candida albicans*, se encontraron resultados prometedores. (Cobrado. L. et al. 2012)

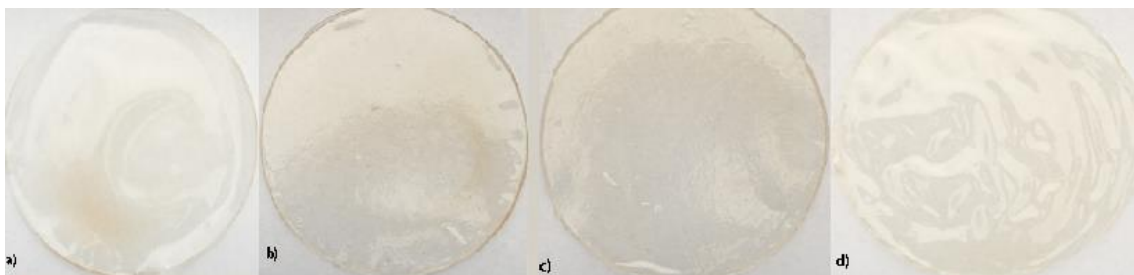


Figura 5.1 Films preparados de a) Qhc-GEA- $Ce^{+3}$ , b) Qhl, c) Qhl-GEA- $Ce^{+3}$  y d) GEA

#### 5.4.1.1 Caracterización FTIR

A fin de caracterizar los *films* y determinar si sus propiedades son las adecuadas para el uso requerido se estudiaron la estructura química, la microestructura y las propiedades físico-químicas. Los biomateriales, tanto naturales como semisintéticos, poseen características de superficie que deben conocerse a los efectos de predecir el comportamiento de los mismos durante el periodo de aplicación. Es importante determinar la composición química, pureza, estabilidad y degradabilidad. Caracterizar polímeros es más complejo que caracterizar compuestos de bajo peso molecular. Las diferentes técnicas disponibles plantean requerimientos específicos en cuanto a la cantidad de muestra y el acondicionamiento del material a ensayar. (Coreño-Alonso. J. et al. 2010)

En la *Figura 5.2* se pueden observar los espectros de GEA, Qhl, Qhc, Qhc-GEA- $Ce^{+3}$  y Qhl-GEA- $Ce^{+3}$ . En el espectro de la GEA pura (gris) se observa una banda ancha a  $3410\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la vibración del enlace NH de los grupos amino, superpuesta con

la vibración O-H de los grupos hidroxilo del agua, que interactúan con los grupos amino de la gelatina (enlace hidrógeno). Presenta también las bandas características de amida I a  $1590\text{ cm}^{-1}$ , debida al estiramiento del grupo C=O, junto a una contribución de las vibraciones de deformación de los enlaces C-N y N-H; amida II a  $1510\text{ cm}^{-1}$ , debida al estiramiento C-N y a la deformación N-H; amida III a  $1237\text{ cm}^{-1}$ .

En los sistemas Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup> y Qhl-GEA-Ce<sup>+3</sup> aparecen las bandas correspondientes a Qhc descritas anteriormente, además de las bandas propias de GEA con un corrimiento de algunas señales debido a la presencia del ion Ce<sup>+3</sup>. Se observa una notable disminución en la intensidad relativa de las bandas de vibración N-H y O-H a  $3408\text{ cm}^{-1}$  en el espectro del *film* Qhl-GEA-Ce<sup>+3</sup> y a  $3498\text{ cm}^{-1}$  para el *film* Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup>. Estos cambios podrían atribuirse a que los iones Ce<sup>+3</sup> se coordinan con los grupos NH y OH presentes en la GEA y en Qhc. (Pastor. J. et al. 2003) (Asensio. R. et al. 2009) (Velandia Cabra. J. 2017) (Aldana. A. et al. 2012)

La banda amida I con un corrimiento a valores menores de  $1502\text{ cm}^{-1}$ , amida II a  $1402\text{ cm}^{-1}$  y amida III a  $1100\text{ cm}^{-1}$ .

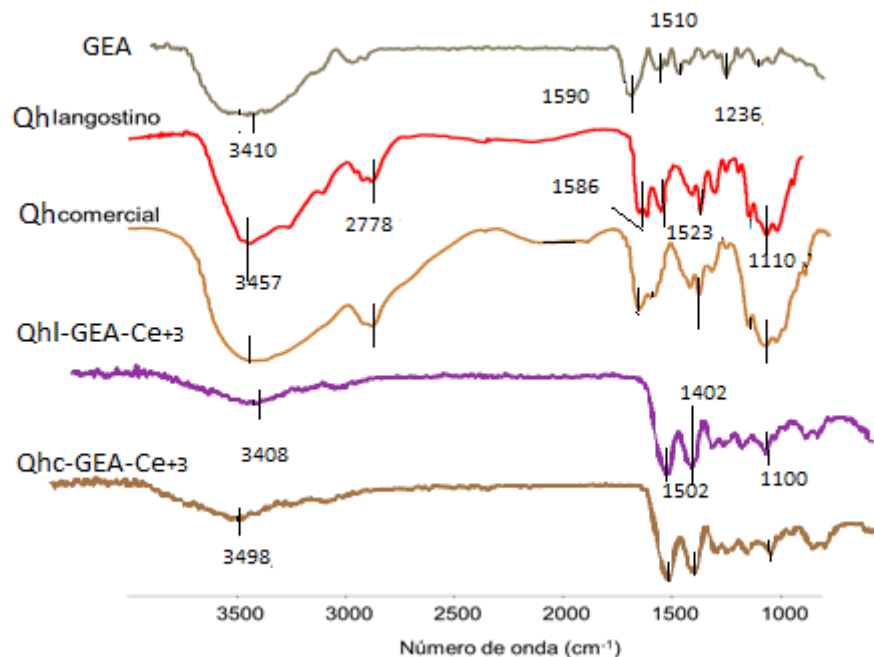
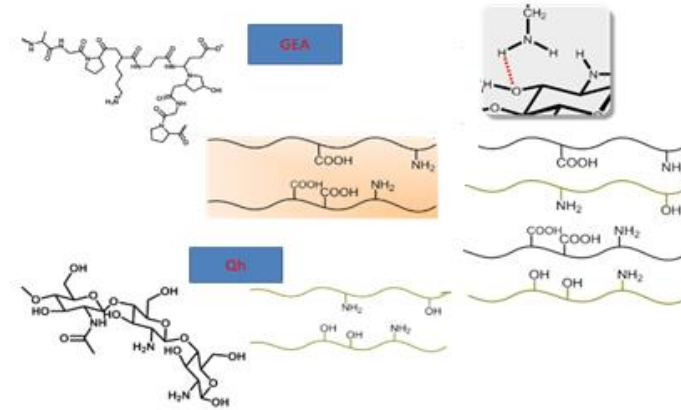


Figura 5.2 Espectros FTIR de los films de Gelatina A (GEA), Quitosano de langostino (Qhl), Quitosano comercial (Qhc), sistemas Qhl-GEA-Ce<sup>+3</sup> y Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup>.

La reacción postulada para la interacción entre quitosano y GEA se muestra en la *Figura 5.3*, donde se evidencia el entrecruzamiento iónico (puente hidrógeno) entre los grupos amino del quitosano y los grupos ácido de la GEA.



*Figura 5.3* Reacción postulada para la interacción entre Qh y GEA

(Adaptación de figura de: García Schejtman. et al. 2015)

#### 5.4.2 Films con incorporación de PVP, Sorbitol y Genipín

Se han reportado trabajos en los que se combina física o químicamente el quitosano con otros polímeros naturales o sintéticos, para mejorar las propiedades mecánicas de las películas. (Aider. M. et al. 2009) Otros trabajos proponen el empleo de agentes de entrecruzamiento, como genipín (Gen) y glutaraldehído, entre otros, como una alternativa favorable para mejorar las propiedades hidrofóbicas, térmicas y mecánicas de las películas. (Huang. C. et al. 2010) En este trabajo de tesis se empleó por un lado, PVP como un polímero capaz de formar interacciones del tipo puente hidrógeno con las cadenas de quitosano y GEA y, por otra parte el empleo de Gen como agente de entrecruzamiento químico y por último sorbitol, como una molécula capaz de interactuar de manera física con las cadenas poliméricas.

#### 5.4.2.1 *Films* con incorporación de PVP: Qhc/Qhl-GEA-PVP-Ce<sup>+3</sup>. Preparación y caracterización por FTIR

Los *films* preparados con PVP resultaron más quebradizos que los de Qhl-GEA por lo que podríamos inferir que el agregado del plastificante no mejoraría las propiedades del material.

En la *Figura 5.4* se muestra el espectro infrarrojo de los *films* de quitosano y gelatina, nitrato de cerio como antifúngico con incorporación de PVP. Se observa, tanto con Qhc como con Qhl, la banda a 1472 cm<sup>-1</sup> correspondiente al estiramiento C-N del anillo lactama del PVP. La banda a 1671 cm<sup>-1</sup> correspondiente al estiramiento C=O características de PVP. (Martinelli, M. et al. 2011)(Mi, F. et al. 2000) El pico a 2917 cm<sup>-1</sup> corresponde al estiramiento C-H alifático, la banda ancha entre 3200-3400 cm<sup>-1</sup> muestra una mayor intensidad relativa.

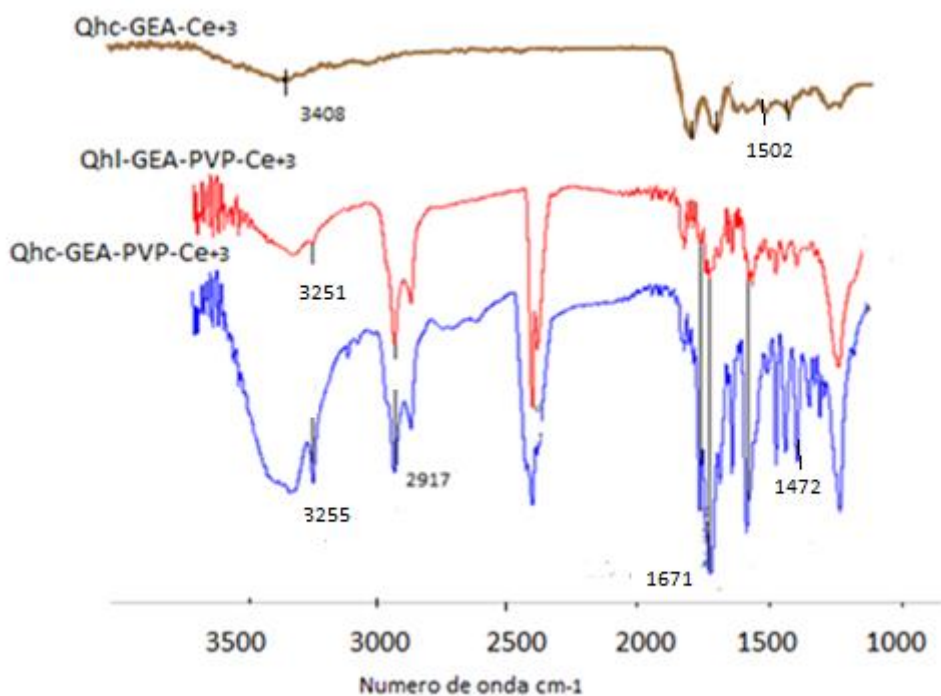
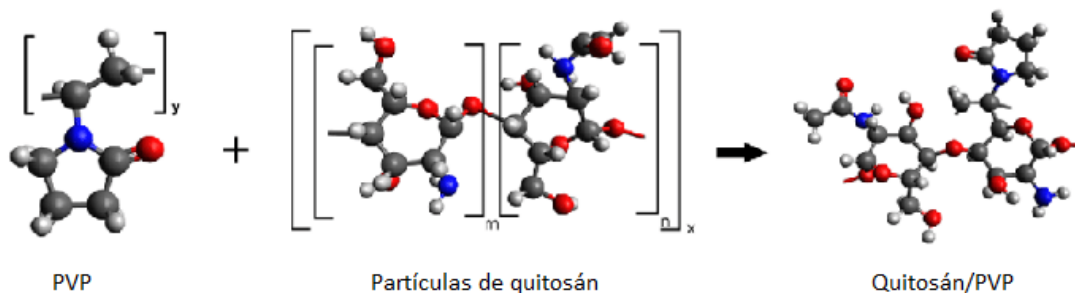


Figura 5.4 Espectro FTIR de los *films* Qhc-GEA-PVP-Ce<sup>+3</sup> y Qhl-GEA-PVP-Ce<sup>+3</sup>

El PVP, es un reticulador iónico, no tóxico utilizado como entrecruzante biocompatible. Mejora las propiedades mecánicas y la estabilidad química del quitosano en medio ácido. Esta modificación tiende a incrementar la resistencia a la degradación bioquímica y microbiológica. La unión entre el PVP y el quitosano ocurre a través de uniones puente hidrógeno, debido a la presencia de grupos  $\text{NH}_2$  y  $\text{OH}$ . En la *Figura 5.5* se muestra un esquema de la unión entre quitosano y PVP. Es una unión física, importante en la adhesión del polímero. La combinación de PVP con algunos componentes biocompatibles, como el quitosano, es una combinación de primera elección en el diseño de biomateriales para aplicaciones biomédicas. (García. M et al. 2017) Otros autores han descrito estos geles a base de quitosano y polivinilpirrolidona, que comprenden una mezcla de quitosano neutralizado y una poli(n-vinil lactama), con y sin plastificante. El gel puede formarse en un empaque de herida o vendaje, donde el hidrocoloide es capaz de absorber exudados sin perder su estructura. También puede ser empleado como un portador de medicamentos para dispositivos transdérmicos.



*Figura 5.5 Esquema de la red formada entre quitosano y PVP*

*(Ribeiro. D. et al. 2019)*

#### 5.4.2.2 *Films* con incorporación de Sorbitol: Qhc/Qhl-GEA-Sor- $\text{Ce}^{+3}$ . Preparación y caracterización por FTIR

Estos *films* resultaron ser más rígidos que los *films* sin agregado de Sor y quebradizos.

En la *Figura 5.6* se muestran los espectros de los *films* Qhc-GEA- $\text{Ce}^{+3}$  con y sin agregado de Sor, así como también el del *film* a partir de Qhl. Se observan las bandas esperadas ya

descriptas, propias del *film* de Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup> y se destaca la mayor intensidad relativa de la banda amida II y un desplazamiento a mayor longitud de onda, de 1542 cm<sup>-1</sup> en el *film* sin Sor, a 1624 cm<sup>-1</sup> en el *film* con Sor. Esta banda es debida a la vibración de los enlaces de grupos carbonilo y amino. Esto indicaría que la interacción entre los polímeros (Qhc-GEA y Qhl-GEA) y las moléculas de plastificante (Sor) en la película, sería mediante enlaces puente hidrógeno, cambiando la frecuencia y forma de vibración del enlace C=ONH. (Tardajo. M. 2013) A 2358 y 2332 cm<sup>-1</sup> se observan, en los *films* con Sor, las bandas debidas a enlaces C-C, C-N. La banda observada a 2922 cm<sup>-1</sup> corresponde al estiramiento de los enlaces C-H. Se observa también la banda a 3407 cm<sup>-1</sup> atribuida al estiramiento del enlace O-H, característica de los polioles en la muestra. (Matet. M. et al. 2013) Estos resultados refuerzan la evidencia de que el Sor interacciona principalmente con el quitosano y que esta interacción está dada por enlaces de hidrógeno.

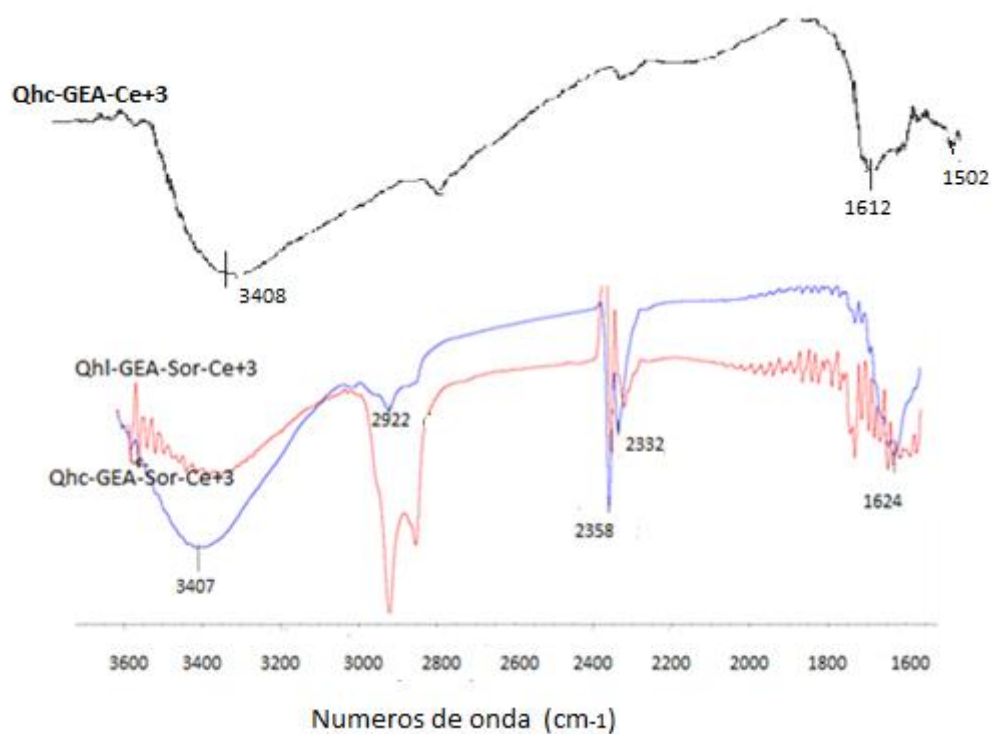


Figura 5.6 Espectros FTIR de los films Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup>, Qhc-GEA-Sor-Ce<sup>+3</sup> y Qhl-GEA-Sor-Ce<sup>+3</sup>

En la *Figura 5.7* se muestra un esquema de una matriz polimérica que incorporó Sor.

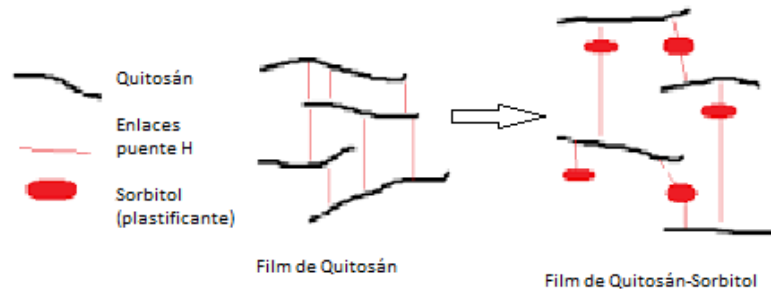


Figura 5.7 Esquema de la interacción entre el quitosano y el sorbitol como plastificante

(Adaptación de: Matos González. C. 2020)

El Sor es un azúcar natural altamente empleado en la industria. Químicamente, es un poliol que cuenta con seis carbonos y seis grupos hidroxilo. Es un azúcar cristalino con un poder endulzante 50% menor que la sacarosa. (Naknaen. P. et al. 2016) Fue aislado por primera vez en 1872 a partir del fruto del fresno (*Sorbus aucuparia*), pero también se encuentra en el jugo de manzana fresco, en la cerezas y en las ciruelas. (Shang. X. et al. 2020). Tiene una amplia gama de aplicaciones como aditivo en la industria alimenticia, cosmética, farmacéutica, papel y cuero, debido a su capacidad de mantener las concentraciones de agua constantes en las mezclas al ser expuesto en ambientes húmedos. Además, es materia prima para diversos productos químicos como es la vitamina C, surfactantes y resinas alquídicas. (Naknaen. P. et al. 2016) En la industria de alimentos, se emplea para mejorar la plasticidad, reducir las calorías y proporcionar una solución que no daña los dientes. En la industria cosmética, se emplea para otorgar plasticidad, sabor dulce, mejorar la solubilidad de ingredientes y la estabilidad microbiológica. El Sor se caracteriza por ser donante y receptor de enlaces puente hidrógeno. (Bajdik. J. et al. 2009) Esta molécula es capaz de interactuar con cadenas poliméricas que posean grupos OH y/o NH, de forma iónica, comportándose como un agente plastificante. Por lo tanto, en las películas modificadas con Sor aumentaría el número de enlaces del tipo puente hidrógeno.

Los estudios han informado que las películas formadas de quitosano puro pueden ser quebradizas y frágiles, mientras que las películas que incorporan plastificantes tales como

Sor tienen mejores propiedades físicas, mejoran la transparencia, humectabilidad y estabilidad térmica. (Lee. W. et al. 1999)

#### **5.4.2.3 Films con incorporación de Gen: Qhc/Qhl-GEA-Gen-Ce<sup>+3</sup>. Preparación y caracterización por FT-IR**

Los *films* con agregado de genipín resultaron de coloración azulada, homogéneos en su superficie, maleables y se retiraron fácilmente de la placa de Petri. La razón de la coloración es debida a que el Gen es un agente reticulante natural eficaz que puede reaccionar espontáneamente con amino ácidos o proteínas formando pigmentos de color azul oscuro. (Rivas. A. et al 2014)

La *Figura 5.8* muestra el espectro infrarrojo de los *films* formados al incorporar Gen.

Las señales características del Gen corresponden a la banda de estiramiento del doble enlace C=O del grupo carbonilo del éster, observada a 1681 cm<sup>-1</sup> y una banda intensa a 1106 cm<sup>-1</sup>, correspondiente al enlace C-O-C. El espectro infrarrojo tomado al sólido obtenido evidencia la presencia de los modos de vibración de tensión característicos de un sistema que contiene enlaces de tipo O-H, C=O, C=C, y C-O perteneciente a un éster, los cuales están presentes en la estructura del Gen. Además, se observa una banda de absorción a bajo número de onda que coincide con una tensión C-O, que indicaría la presencia del grupo funcional éster conjugado y la banda correspondiente a la vibración de deformación C-H fuera del plano asociada a un ciclo alqueno. (Guilherme. J. 2007)

En el espectro del *film* entrecruzado con quitosano y gelatina se observa la desaparición de dichas señales características del genipín y la aparición de una señal a 1647 cm<sup>-1</sup>, que corresponde a una banda de vibración de C=O de amida, lo cual indica que el entrecruzamiento se llevó a cabo. (Schejtman. S. et al. 2015)

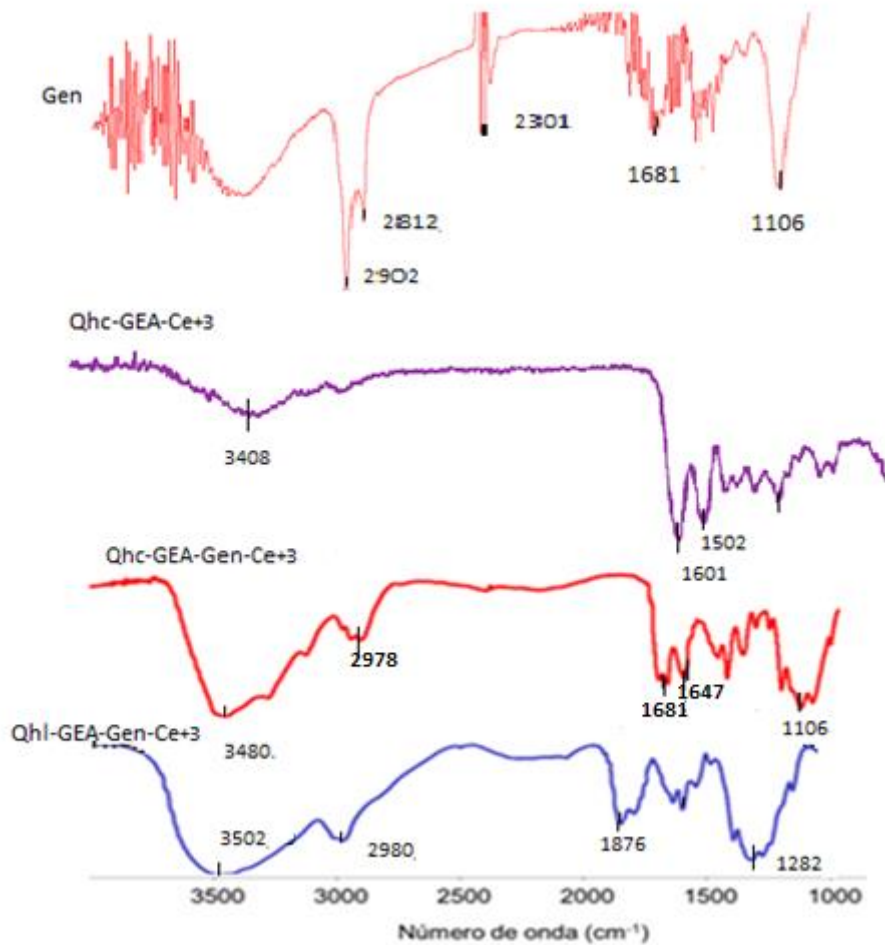


Figura 5.8 Espectro FTIR del sistema Qhc-GEA-Gen-Ce<sup>+3</sup>/Qhl-GEA-Gen-Ce<sup>+3</sup>

En la *Figura 5.9 a y b*, se muestra la reacción entre quitosano y genipín y el esquema del entrecruzamiento entre Gen y la red Qhc-GEA. Se producen dos reacciones separadas. (Schejtman, S. et al. 2015)

La primera reacción consiste en un ataque nucleofílico por parte de los grupos amino del polímero, en este caso Qhc y/o GE, sobre el carbono 3 del Gen, que da lugar a la formación de un compuesto heterocíclico del Gen unido al residuo de glucosamina del polímero. La segunda reacción, más lenta, consiste en una sustitución nucleofílica del grupo éster del Gen, liberando metanol y formándose un enlace amida con el polímero. Simultáneamente, puede ocurrir una reacción de polimerización entre moléculas de Gen, lo cual puede dar lugar al entrecruzamiento a través de homopolímeros de Gen. (Chen, H. et al. 2006)

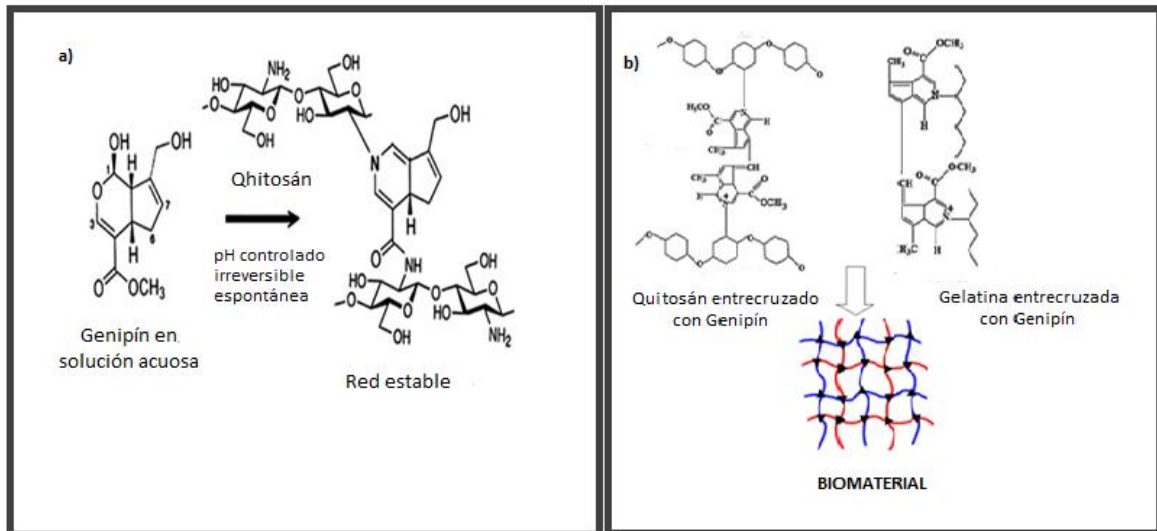


Figura 5.9 a) Interacción entre quitosano y genipín para formar una red estable b) Redes tridimensionales al combinar quitosano con gelatina y genipín

(Adaptación de Aldana. A.et al. 2012)

#### 5.4.2.3.1. Variación de la concentración agregada de Gen

Se evaluaron por FTIR las variaciones de concentración de la solución de Gen agregada a los *films* de Qh-GEA. En la *Figura 5.10* se observan los espectros obtenidos, donde se observa que con las tres concentraciones de Gen agregadas se forman los *films* con las bandas esperables para el entrecruzamiento, tal como se describió en la *Figura 5.8*. Debido a que no se encontraron diferencias de bandas con las tres concentraciones probadas se continuó trabajando con la menor concentración de Gen debido a su costo.

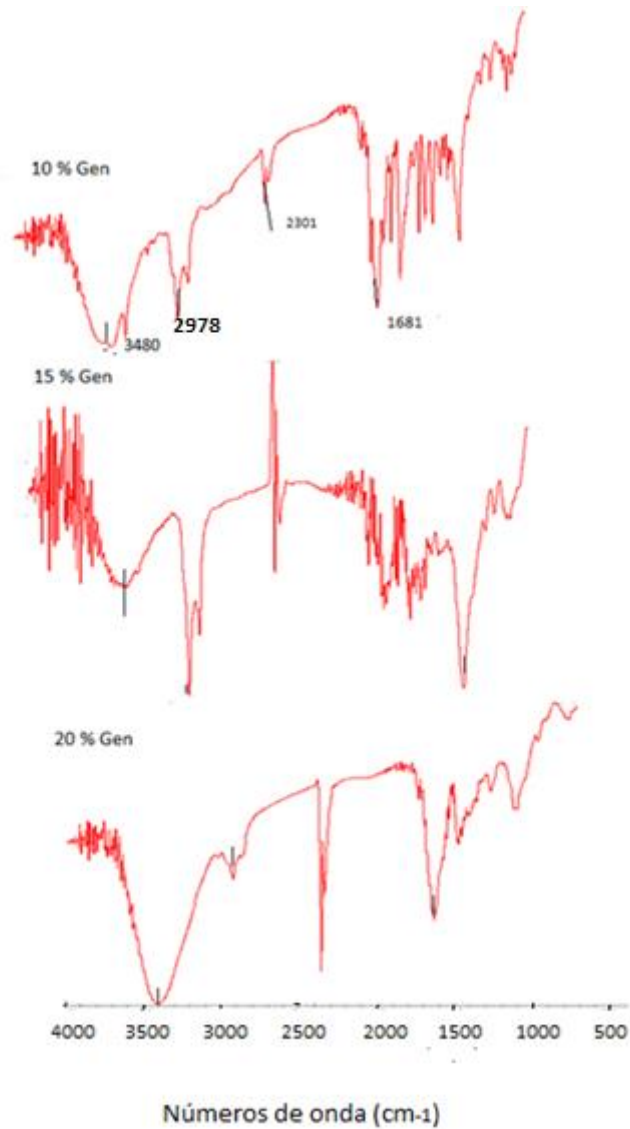


Figura 5.10 Espectros FTIR de los films Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup> con diferentes concentraciones de Gen agregadas. a) 10 % de Gen, b) 15 % de Gen y c) 20 % de Gen

### 5.4.3 Determinación de Propiedades de Transporte

#### 5.4.3.1 Determinación de Permeabilidad al vapor de agua de los *films* obtenidos

En la *Tabla 5.1* se muestran los resultados del WVP y WVTR de los *films* Qhl-GEA-Ce<sup>+3</sup>, Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup>. Se observó que los *films* de Qhc son marcadamente más permeables al vapor de agua que los de Qhl, este comportamiento es atribuido a la cantidad de grupos amino libres, tal como fue discutido en el capítulo 4, apartado 4.5.4.1.3.

Como se mencionó en el capítulo 4, apartado 4.6, los materiales con dichos valores son considerados semi-permeables, los cuales pueden ser utilizados en diferentes aplicaciones biomédicas, por ejemplo apósitos para heridas. (Valencia-Gómez. L. et al. 2016)

Tabla 5.1 Valores de WVP y WVTR de los sistemas ensayados

Film	WVP ( $\times 10^{12}$ g.m <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> .Pa <sup>-1</sup> )	WVTR ( $\times 10^{-2}$ g.m <sup>-2</sup> .dia <sup>-1</sup> )
Qhl-GEA-Ce <sup>+3</sup>	0,76	7,91
Qhc-GEA-Ce <sup>+3</sup>	1,25	7,60

En la *Tabla 5.2* se muestran los resultados obtenidos de la WVP y WVTR, correspondientes a los *films* Qhl-GEA-Ce<sup>+3</sup>, Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup> con agregado de los diferentes entrecruzantes probados.

Tabla 5.2 Valores de Permeabilidad al Vapor de Agua (WVP) y Velocidad de Permeación al Vapor de Agua (WVTR)

Film	WVP ( $\times 10^{12}$ g.m <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> .Pa <sup>-1</sup> )	WVTR ( $\times 10^{-2}$ g.m <sup>-2</sup> .dia <sup>-1</sup> )
Qhc-GEA-PVP-Ce <sup>+3</sup>	1,51	7,65
Qhc-GEA-Gen-Ce <sup>+3</sup>	1,36	7,41
Qhc-GEA-Sor-Ce <sup>+3</sup>	1,29	5,17
Qhl-GEA-PVP-Ce <sup>+3</sup>	0,88	3,56
Qhl-GEA-Gen-Ce <sup>+3</sup>	0,66	3,44
Qhl-GEA-Sor-Ce <sup>+3</sup>	0,57	3,06

Se observó que, tanto el valor de WVP como de WVTR, aumentaron considerablemente en los *films* de Qhc, respecto de los preparados con Qhl, continuando con el mismo comportamiento ya observado para *films* de Qhc y Qhl sin agregado de otros polímeros.

Si se comparan los diferentes *films*, aquellos que fueron preparados con PVP mostraron valores de permeabilidad al vapor de agua más elevados, aquellos en los que se agregó Sor los valores de permeabilidad al vapor de agua resultaron menores. Por otro lado, los *films* con agregado Gen como entrecruzante mostraron valores intermedios a los anteriores. El uso de Gen como agente de entrecruzamiento da lugar a mejoras en las propiedades mecánicas y la estabilidad de las películas en agua". (Rivas. A. et al. 2014)

En el caso de quitosano de langostino el comportamiento es parecido con menores permeabilidades en el caso de Sor agregado.

#### 5.4.3.2 Índice de Hinchamiento de los *films* Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup> y Qhl-GEA-Ce<sup>+3</sup>

El índice de hinchamiento (IH) de los diferentes *films* fue determinado a pH 4 y 7, simulando los valores extremos durante el exudado de una herida. El IH de los *films* fue medido durante 3 horas, pero se dejaron en contacto con cada uno de los buffers por 24 h para evaluar su estabilidad. Este tiempo es importante considerando el uso del *film* como apósito para heridas.

En la *Figura 5.11* se muestran los valores de los IH para los *films* Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup> y Qhl-GEA-Ce<sup>+3</sup> a pH 4 y 7.

El *film* de Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup>, a pH 4, posee un valor de IH similar al del Qhl-GEA-Ce<sup>+3</sup>. Estos valores se correlacionan con los grupos amino libres en la cadena de quitosano. A pH 4, la mayoría de los grupos NH<sub>2</sub> pertenecientes al Qhc y Qhl están protonados, lo que ocasiona mayor repulsión electrostática y la consecuente separación de las cadenas del polímero, resultando en valores de hinchamiento elevados. El quitosano se comporta como un polielectrolito lineal, con un pK de alrededor de 6.5, por lo tanto a pH bajos los residuos de glucosamina están cargados positivamente, debido a la protonación de sus residuos aminos, conteniendo una alta densidad de cargas positivas. Se plantea que cuando la carga positiva sobre el C-2 del monómero de glucosamina se encuentra por debajo de pH 6, el quitosano es más soluble. (Velásquez C. 2008) Es importante destacar que, tanto los *films* Qhl-GEA-Ce<sup>+3</sup>, como los *films* Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup>, son estables a ambos valores de pH. A pH 7 los *films* de Qhl muestran valores de hinchamiento un poco menores que para el Qhc.

Por otra parte, en todos los casos se evidenció una caída rápida de los valores máximos alcanzados, este efecto es llamado: “de sobrehinchamiento” u “*overshooting effect*”. Este consiste en un sobrehinchamiento inicial del hidrogel seguido de una disminución del mismo hasta alcanzar el equilibrio. Se han descrito distintas explicaciones posibles de este efecto. Algunos autores, proponen que el agua difunde en la red antes de que la cadena se relaje (máximo en la curva de hinchamiento), cuando las cadenas se relajan el sistema alcanza el equilibrio y el agua que estaba en exceso tiende a abandonar el hidrogel. (Martínez. M. 2016). Otra explicación alternativa hace referencia a la presencia de fuerzas intermoleculares que aumentan el grado de entrecruzamiento, pudiendo establecerse entrecruzamientos físicos adicionales por formación de enlaces puente hidrógeno (Díez-Peña. E. et al. 2003) o por pares iónicos. (Valencia. J. et al 2002) También se ha explicado este fenómeno basándose en el hecho que, durante la formación de un *cluster* de moléculas de agua (aglomerados de moléculas) en la matriz del hidrogel, las celdas de hidratación ion-dipolo se aproximan y se superponen originando una expulsión de moléculas de agua debido a compatibilidad termodinámica. (Bhardwaj. Y. et al. 2000)

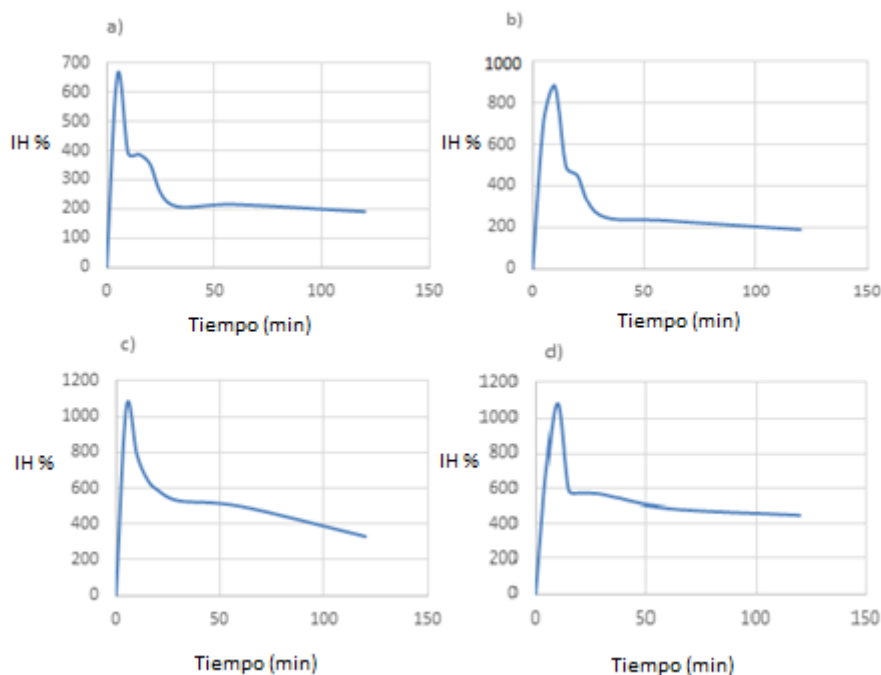


Figura 5.11 Valores de Índice de hinchamiento en el equilibrio a) Qhl-GEA-Ce<sup>+3</sup> a pH 7 b) Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup> a pH 7 c) Qhl-GEA-Ce<sup>+3</sup> a pH 4 d) Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup> a pH 4

#### 5.4.3.2.1 *Films* Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup> y Qhl-GEA-Ce<sup>+3</sup> con diferentes entrecruzantes

En la *Figura 5.12* se muestran los valores de IH en el equilibrio correspondientes a los *films* de Qhl-GEA-Ce<sup>+3</sup> preparados con entrecruzantes a pH 4 y 7. Se observa que el “overshooting effect” es menos marcado que en los *films* sin entrecruzantes. Los IH a pH 4 fueron en general mayores que a pH 7, lo que ya se explicó en el apartado anterior. Los *films* con PVP y Sor se disolvieron en poco tiempo a ambos valores de pH, debido a su alta solubilidad en agua. Si bien el Sor y el PVP son plastificantes que mejoran las propiedades mecánicas, incrementan el hinchamiento, por un aumento en la retención de las moléculas de agua. (Aldana. A. et al. 2017) Los *films* entrecruzados con Gen fueron los menos hinchables, pudiendo atribuirse esto a la formación de una red covalentemente entrecruzada a través de los grupos amino del quitosano y la gelatina. Por otro lado, estudios en complejos de GEA-Ce<sup>+3</sup>, han demostrado que los grupos carboxilos de la gelatina se coordinan con los iones Ce<sup>+3</sup>, comportándose el ión como un agente entrecruzante, además de poseer propiedad antifúngica. (Huang. Y. et al. 2008)

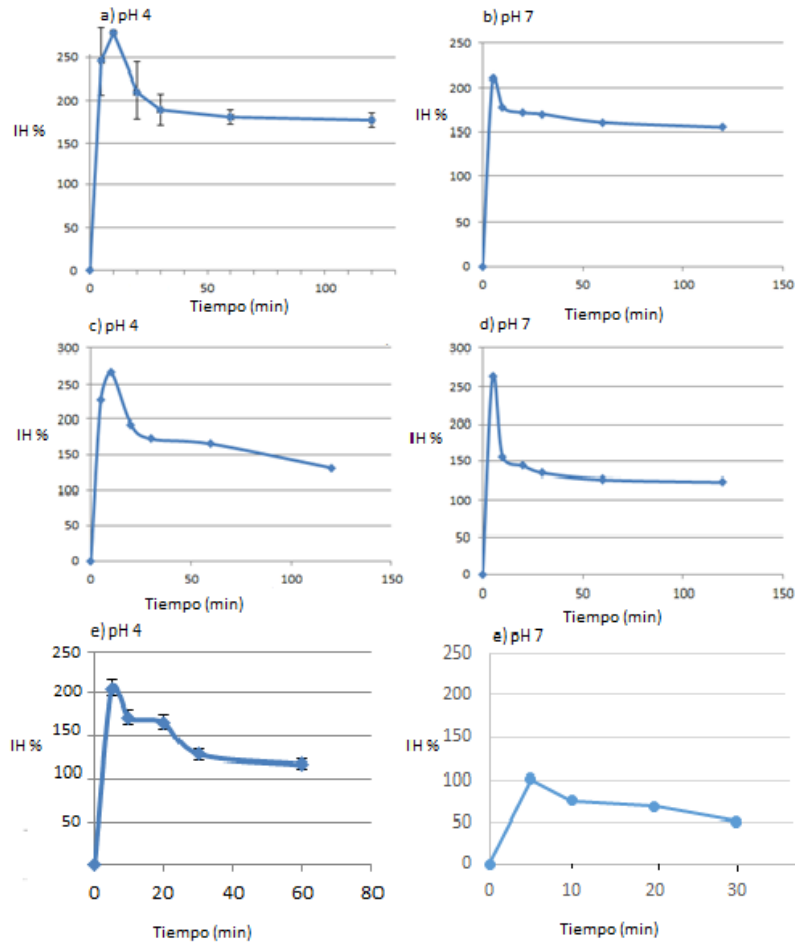


Figura 5.12 Valores de Indices de hinchamiento en el equilibrio a) Qhl-GEA-PVP-Ce<sup>+3</sup> a pH 4 b) Qhl-GEA-PVP-Ce<sup>+3</sup> a pH 7 c) Qhl-GEA-Sor-Ce<sup>+3</sup> a pH 4 d) Qhl-GEA-Sor-Ce<sup>+3</sup> a pH 7 e) Qhl-GEA-Gen-Ce<sup>+3</sup> a pH 4 f) Qhl-GEA-Gen-Ce<sup>+3</sup> a pH 7

En la Figura 5.13 se muestra una gráfica comparativa de todos los *films* juntos, a ambos valores de pH. En ella pueden observarse las diferencias detalladas en el párrafo anterior para la Figura 5.12.

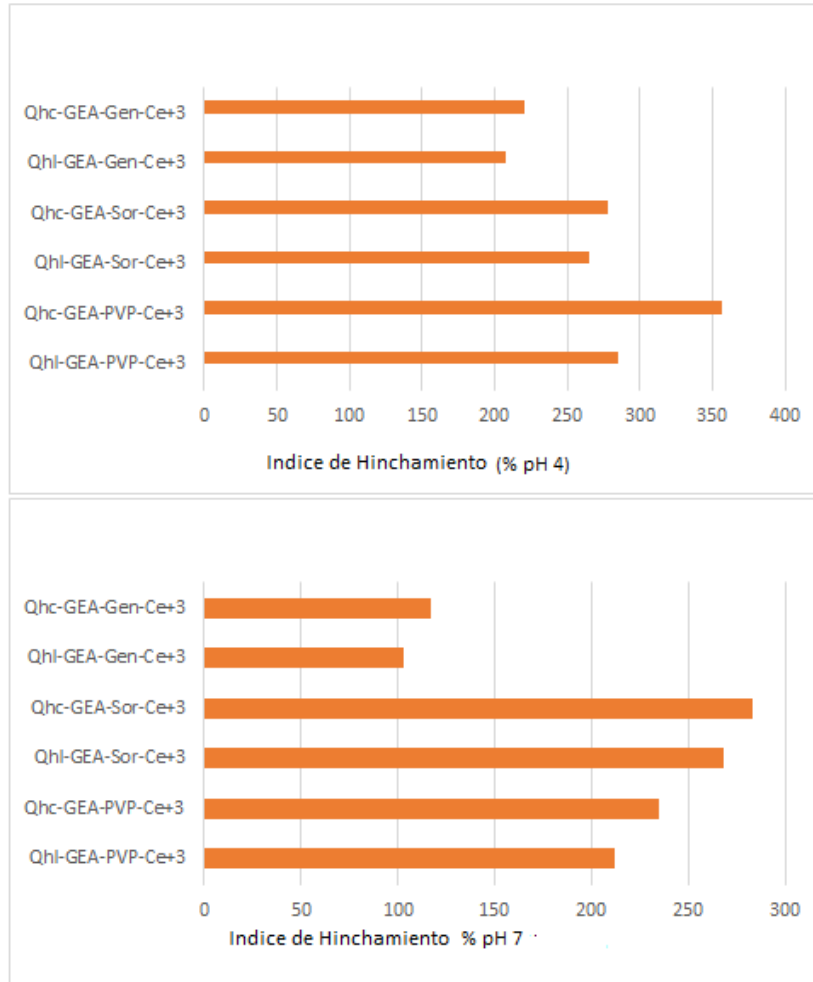


Figura 5.13 Índice de hinchamiento de todos los films obtenidos a ambos valores de pH

## 5.5 Conclusiones parciales

Los materiales obtenidos a partir de Qhl tienen propiedades físico-química comparables con los obtenidos a partir de Qhc y podrían ser potencialmente aplicados como apósitos para heridas.

Los *films* obtenidos con Qhl-GEA-Ce<sup>+3</sup> presentan características prometedoras para su utilización biomédica. Resultaron ser más flexibles que los de Qhl sin GEA, debiendo agregarse un agente antifúngico, como el Ce<sup>+3</sup>, para su conservación. Macroscópicamente se observó que la presencia de Cerio<sup>+3</sup> evita la contaminación de los *films* sin alterar las propiedades físicas de los mismos.

Los *films* preparados con agregado de PVP resultaron muy quebradizos y arrojaron valores de índices de hinchamiento muy elevados para el uso que se propone.

En el caso de Sor, al ser este un azúcar soluble en agua, se observó un índice de hinchamiento elevado resultando estos *films* altamente hidrofílicos, poco estables en medio acuoso y por tanto inadecuados para ser utilizados como apósitos, de acuerdo a lo propuesto en esta tesis

En cuanto al agregado de Gen, los resultados obtenidos permitieron seleccionar el sistema preparado a partir de Qhl-GEA-Gen-Ce<sup>+3</sup>, para continuar. La elección se basó en los óptimos valores de permeabilidad de los *films*, hinchamientos apropiados para ser usados sobre superficies biológicas, como por ejemplo en el tratamiento de heridas superficiales, quemaduras leves, zonas donantes, heridas post-operatorias, abrasiones y laceraciones menores. Por otro lado, la decisión se basó en la capacidad del Gen de entrecruzar las moléculas polares como el quitosano, seleccionándose una concentración de entrecruzante del 10% debido al costo elevado del mismo.

## 5.6 Bibliografía

Aider. M, Halleux. D. et al. 2009. Skim Acidic Milk whey cryoconcentration on and Assessment of its Functional Properties: Impact of Processing Conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologie*. 10(3): 334-341.

Aldana. A. et al. 2012. Películas de quitosano modificadas selectivamente por una cara con moléculas dendríticas. *Revista de química de materiales*.

Aldana. A, González. A. et al. 2012. Preparation and characterization of chitosan/genipin/poly(N-vinyl -2-pyrrolidone) films for controlled release drugs. *Materials Chem. and Phys*)

Aldana. A, Strumia. M. C. & Martinelli. M. 2013. Síntesis y Caracterización de películas de quitosano modificadas en una de las caras con dendrones.

Aldana. A. et al. 2012. Evaluation of Graft Copolymerization of Acrylic Monomers onto Natural Polymers by Means Infrared Spectroscopy. Instituto Tecnológico de Ciudad Madero, División de Estudios de Posgrado e Investigación. Instituto Tecnológico de Querétaro, Departamento de Metal-Mecánica México.

Al-Dwairi. Z, AL-Quran. F. et al. 2012. The effect of antifungal agents on Surface properties of poly(methyl methacrylate) and its relation to adherence of *Candida albicans*. *J.Prostodont Res. Japan Prosthodontic Society*. 56(4): 272-280.

Asensio. R., San Andres Moya. M. et al. 2009. Analytical characterization of polymers used in conservation and restoration by ATR-FTIR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 395(7): 2081-96.

Bajdik. J, Marciello. M. et al. 2009. Evaluation of surface and microstructure of differently plasticized chitosan films. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 49(3): 655-659.

Bhardwaj. Y, Sabharwal. S. et al. 2000. Dynamic swelling kinetics of radiation polymerized poly(2-hydroxy ethyl methacrylate) and 2-hydroxy ethyl methacrylate- cationic hydrogels - Part I: Swelling in aqueous solution. *Int. J. Polym. Mater*. 17(3): 239–252.

Butler. M. F, Ng, Y. F. et al. 2003. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 41(24): 3941-3953.

Casariego. A, González. J. et al. 2002. Evaluación de las propiedades mecánicas de películas biodegradables: efecto de la concentración de quitosana y la concentración de sorbitol. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*. (336): 29-32.

Chen. H. et al. 2006. Genipin crosslinked alginatechitosan microcapsules: membrane characterization and optimization of crosslinking reaction. *Biomacromolecules*. 7: 2091-2098.

Cobrado. L, Azevedo. M. et al. 2012. Cerium, chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 67(5): 1159-1162.

Coreño-Alonso. J, Méndez-Bautista. M. 2010. Relationship between structure and properties of polymers. *Educación química*. 21(4): 291-299.

Díez-Peña. E, Quijada-Garrido. I. et al. 2003. Analysis of the Swelling Dynamics of Cross-Linked P(N-iPAAm-co-MAA) Copolymers and Their Homopolymers under Acidic Medium. A Kinetics Interpretation of the Overshooting Effect. *Macromolecules*. 36(7): 2475-2483.

García. M, Aldana. A. et al. 2017. Bioadhesive and biocompatible films as wound dressing materials based on a novel dendronized chitosan loaded with ciprofloxacin. *Carbohydrate polymers*. 175: 75-86.

García Schejtman. S. et al. 2015. Gelatin films dendronized selectively on one side: enhancing antimicrobial properties and water repellence. *Polymer Bulletin*. 72(12): 3043-3062.

Guilherme. J. 2007. Esferas de goma do cajueiro e quitosana para liberação de fármacos. *Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza- Brasil*.

Huang. C. et al. 2010. Preparation and characterization of gelatin/cerium (III) film. *Journal of Rare Earths*. 28(5): 756-759.

Huang. Y, Wei. T. 2008. Preparation and characterization of novel Ce(III)-gelatin complex. *J. of Applied Polymer Science*. 108(6): 3804-3807.

Huerta. A. et al. 2018. Obtención y caracterización de quitosano entrecruzado con ácido cítrico. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 19(5): 227-235.

Jridi. M. et al. 2014. Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin–chitosan composite edible films. *International journal of biological macromolecules*. 67: 373-379.

Jyotishkumar. P. et al. 2015. *Characterization of Polymer Blends*.

Marín Silva. D & Pinotti. A. N. 2017. Ensamblado de matrices compuestas de nanopartículas de cobre con PVP y quitosano. In XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos CYTAL (Mar del Plata, 18 al 20 de septiembre de 2017).

Martinelli. M. et al. 2011. Preparation and characterization of hitosan/genipin/poly(N-vinyl -2-pyrrolidone) films for controlled release drugs. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Martínez Martínez. M. 2016. Desarrollo y aplicaciones de hidrogeles para la administración y liberación modificada de fármacos.

Matet. M. et al. 2013. Innovative thermoplastic chitosan obtained by thermo-mechanical mixing with polyol plasticizers. *Carbohydrate polymers*. 95(1): 241-251.

Matos González. C. 2020. Revisión de literatura: Biopelículas a base de quitosano como potencial aplicación en empaque de alimentos. Proyecto especial de graduación para optar al título de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura. Honduras.

Mi. F. et al. 2000. *J. of Polymer Sci. Part A: Polymer Chem*. 38: 2804- 2814.

Mourya. V, Inamdar. N. 2008. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore, *React. Funct. Polym*. 68: 1013.

Naknaen. P. et al. 2016. Effect of partial replacement of sucrose with humectant in the osmotic solution on the characteristics of osmo-dried cantaloupe. *International Journal of Fruit Science*. 16(3): 225-241.

Nowzari. F. et al. 2013. Comparison of chitosan–gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food chemistry*. 141(3): 1667-1672.

Oak. M. et al. 2012. Smart polymers for peptide and protein parenteral sustained delivery. *Drug. Disc. T: Tech.* 9(2): 131.

Pastor. J. et al. 2003. Caracterización de materiales polímeros mediante la utilización de la micro espectroscopia vibracional (Raman, FTIR y FT-Raman). *Revista Iberoamericana de polímeros.* 4(3): 1-43.

Pella. M. et al. 2018. Chitosan-based hydrogels: from preparation to biomedical applications. *Carboh. Pol.* <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.033> (2018).

Rangel-Marrón. M. et al. 2013. Optimization of the moisture content, thickness, water solubility and water vapor permeability of sodium alginate edible films. *Prosiding. Recent Advances in Chemical Engineering, Biochemistry and Computational Chemistry.* Paris, Perancis. 29-31.

Rivas. A & Velásquez. C. 2014. Obtención y caracterización del entrecruzante natural genipina a partir del fruto del caruto (*Genipa Americana L.*). Trabajo de Grado para optar al título de Licenciada en Química), Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias Departamento de Química, Laboratorio de Polímeros, Colombia.

Ribeiro. D. et al. 2019. Analysis about the Behavior and Modeling of pH-Sensitive Hydrogels with Different Ratios of Chitosan and Polyvinylpyrrolidone. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering.* 7: 64-76.

Schejtman. S. et al. 2015. Gelatin films dendronized selectively on one side: enhancing antimicrobial properties and water repellence. *Polymer Bulletin.* 72(12): 3043-3062.

Sepúlveda. L & Alzate. C. 2016. Aplicaciones de mezclas de biopolímeros y polímeros sintéticos: revisión bibliográfica/Applications of biopolymers and synthetic polymers blends: literature review/Aplicacoes de misturas de biopolímeros e polímeros sinteticoc: revisao da literatura. *Revista Científica.* (25): 252-265.

Shang. X. et al. 2020. Preliminary identification of candidate genes associated with the peach fruit sorbitol content based on comparative transcriptome analysis. *Scientia Horticulturae.* 263: 109151.

Tardajo. M. 2013. Nuevos materiales de interés biomédico a partir de la funcionalización de vinilpirrolidona. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química-Física. Madrid.

Valencia. J, Piérola. I. 2002. Swelling kinetics of poly(N-vinylimidazole-co-sodium styrenesulfonate) hydrogels. *J. Appl. Polym. Sci.* 83 (1): 191-200.

Valencia-Gómez. L. et al. 2016. Apósitos de polímeros naturales para regeneración de piel. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica.* 37(3): 235-249.

Velandia Cabra. J. 2017. Identificación de polímeros por espectroscopía infrarroja. *Revista Ontare.* 5: 115-140.

Velásquez. C. 2003. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de polímeros.* 4(2): 91.

Velásquez. C. 2008. Some potentialities of chitin and chitosan for uses related to agriculture in Latin America. *Revista Científica UDO Agrícola.* 8(1):1-22.

## Capítulo 6 - Síntesis de Biopolímeros

### 6.1 Objetivo

Sintetizar *films* de quitosano y gelatina con el agregado de compuestos extraídos de fuentes naturales como el ácido tánico, la gelatina de pescado y el empleo de aceites esenciales comerciales como agentes antifúngicos, para obtener biomateriales con potencial uso en biomedicina.

### 6.2 Introducción

A lo largo de este manuscrito se ha destacado la importancia de desarrollar biomateriales basados en polímeros de origen natural, tales como el quitosano y la gelatina, y la necesidad de modificarlos en pos de mejorar sus propiedades físico-químicas y mecánicas, sin descuidar la biocompatibilidad de los mismos. De este modo, se han destacado las reacciones de entrecruzamiento como una alternativa válida para asegurar la estabilidad y la resistencia mecánica de un biomaterial.

Sobre esta base se ha desarrollado el capítulo precedente y se desarrolla el actual. En esta sección se aborda la modificación de polímeros naturales tales como quitosano, extraído de cáscaras de langostino y gelatina extraída de piel de merluza, con ácido tánico (AT).

#### 6.2.1 Acido Tánico

El AT es un polifenol que se distribuye ampliamente como componente funcional importante de los tejidos vegetales; es reconocido por su capacidad antioxidante debido a sus múltiples grupos fenólicos que pueden interactuar con macromoléculas biológicas. Es un ácido compuesto por glucosa y ácidos fenólicos. Su fórmula química es  $C_{76}H_{52}O_{46}$ , de masa molar  $1701,19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Figura 1.12). Está presente en el vino tinto, café, té, verduras como espinaca, pasas negras y guayaba. Se lo encuentra acumulado en las cortezas y raíces y en menor proporción en hojas. Debido a sus propiedades astringentes es utilizado como principio activo a nivel intestinal en diarreas. Se utiliza también en

varias industrias, como la de curtido de cueros, como mordiente en la industria textil para fijar los colores a las fibras, en el tratamiento de maderas para exteriores volviéndolas más resistentes al agua, calor y frío, en técnicas de tinción de laboratorio para colorear flagelos de procariotas.

El uso de AT para reticular películas basadas en quitosano y gelatina, podría ser una alternativa para conseguir las propiedades adecuadas para el desarrollo de películas con potenciales aplicaciones biomédicas. (Strauss. G. et al. 2004)

### **6.2.2 Gelatina de pescado**

Hasta la fecha se han realizado diversos estudios sobre obtención de gelatina a partir de piel de pescado como una alternativa a la gelatina comercial derivada de la piel y huesos de bovino y porcino. Se sabe que la gelatina forma películas claras, flexibles, fuertes e impermeables al oxígeno cuando se moldean películas a partir de soluciones acuosas en presencia de plastificantes (Lacroix. M. et al. 2014).

Debido al bien conocido problema de acumulación de desechos de la industria pesquera, los investigadores han buscado en los últimos años la reutilización de pieles de pescado, como materia prima para obtener gelatina de alta calidad. De esta manera, se aporta una solución alternativa a un gran problema ambiental, a la vez que se promueve el desarrollo industrial de nuevos biopolímeros que reemplacen a los derivados del petróleo.

La industria pesquera apostada en la ciudad de Comodoro Rivadavia recoge, entre otras especies, merluza para la comercialización de la carne. La merluza es despojada de su piel para aprovechar la carne y filetearla. Los restos de piel son descartados como residuo. A partir de este residuo, es que se propuso obtener gelatina de pescado (GP). Esto aumentaría el valor agregado del producto formado.

El uso de la gelatina en la industria farmacéutica, en regeneración de tejidos y protección de heridas, es posible debido a sus propiedades fisicoquímicas, texturales, reológicas y sensoriales. (Boran. G. et al. 2010).

### 6.2.2.1 Metodología para la Obtención de Gelatina de Pescado (GP)

La gelatina es un polímero derivado de la hidrólisis del colágeno. Este último es una macromolécula que presenta una estructura en forma de triple hélice estabilizada por enlaces puente hidrógeno. Cuando los tejidos conectivos de mamíferos y/o peces se someten a procesos degradativos que usualmente involucran hidrólisis alcalina o ácida, seguido de una extracción acuosa en caliente, la estructura fibrosa del colágeno se rompe irreversiblemente y se obtiene la gelatina. Por consiguiente, el proceso de manufactura involucra la destrucción de la estructura terciaria, secundaria, y en alguna medida también de la estructura primaria del colágeno nativo. (Figura 6.1)

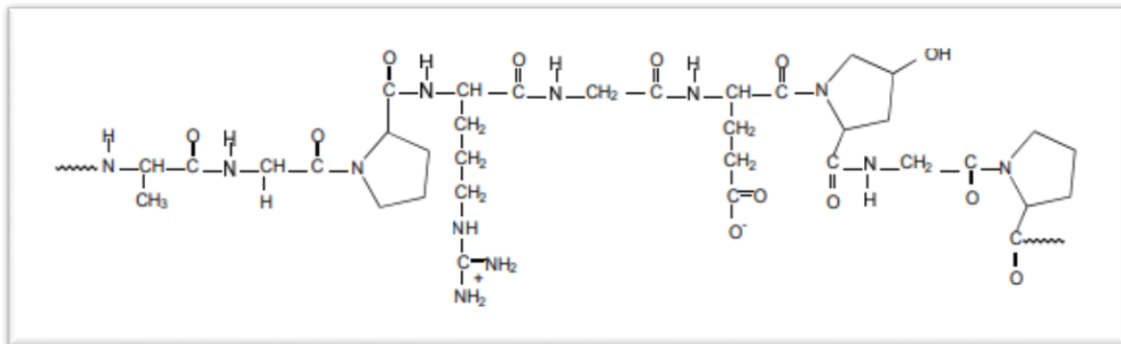


Figura 6.1 Esquema de la secuencia aminoacídica típica de la gelatina: -Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro-

La distribución del peso molecular de los polipéptidos de gelatina depende tanto de la materia prima como del tipo de pretratamiento y de las condiciones de extracción. La polidispersión de las macromoléculas producidas posee una gran influencia sobre las propiedades físicas de la gelatina y afecta especialmente a propiedades reológicas, tales como la fuerza de gel, viscosidad y temperatura de fusión. Estas propiedades están vinculadas tanto a la masa molecular como a las interacciones intermoleculares, determinadas por la composición de aminoácidos y la relación de cadenas  $\alpha/\beta$  presentes en la gelatina. (Cho. S. et al. 2006) La conversión de colágeno a gelatina puede llevarse a cabo mediante dos procesos: ácido o alcalino. Dependiendo del proceso utilizado se derivan dos tipos de gelatina: tipo A y tipo B, respectivamente. Durante el tratamiento alcalino las proteínas pierden nitrógeno y como resultado de esta pérdida también se

eliminan grupos amida. El punto isoeléctrico (pI) de la gelatina obtenida con este procedimiento puede ser de hasta 4,8. Por el contrario, la naturaleza eléctrica del colágeno no es sustancialmente modificada mediante el proceso de extracción ácido y, como resultado se obtiene una gelatina con un punto isoeléctrico relativamente alto. Es decir, cuando los grupos amida permanecen intactos, se puede encontrar gelatina con pI de hasta 9,4. (Eluk. D. 2014) La gelatina es soluble en agua a temperatura media (50°C), formando soluciones coloidales que al enfriarse (<30°C) forman una red tridimensional rígida en forma de gel. Es decir, las cadenas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) generadas durante la extracción, al enfriarse inician una serie de interacciones que promueven la recuperación parcial de la triple hélice del colágeno inicial. Estas interacciones están dominadas principalmente por uniones tipo puente hidrógeno, donde las regiones Gly-Pro-Hyp juegan un papel de gran importancia para la iniciación y estabilización de la estructura formada, la cual le permite poseer gran rigidez. (Gómez. J. et al. 2002) (Gomez. M. 2012)

### 6.2.3 Aceites Esenciales

La incorporación de compuestos con actividad antimicrobiana en la formulación de *films* poliméricos es una de las estrategias para la obtención de materiales destinados a usos biomédicos. Los aceites esenciales de plantas tienen la particularidad de presentar propiedades antimicrobianas y antioxidantes y se han realizado numerosos estudios para su incorporación en la formulación de *films*. Los aceites se consideran metabolitos secundarios de los tejidos vegetales, sintetizados por las plantas, producidos al momento de activarse mecanismos de defensa como respuesta a factores ambientales y ecológicos. Presentan roles de defensa, atracción de polinizadores, entre otros. Juegan un papel importante en la defensa de las plantas, puesto que muchos de ellos poseen propiedades antimicrobianas, antiparasitarias, insecticidas, antivirales, antifúngicas y antioxidantes. Los aceites son fracciones líquidas volátiles, generalmente mezclas homogéneas de hasta 100 compuestos químicos orgánicos, provenientes de la familia química de los terpenoides. Generan diversos aromas agradables y perceptibles al ser humano. Bajo condiciones de temperatura ambiental, son líquidos poco densos, pero con mayor viscosidad que el agua. Son inflamables, no son tóxicos, mientras la dosis suministrada no supere los límites de toxicidad, aunque pueden provocar alergias en personas sensibles a determinados terpenoides. (Cadby. P. et al. 2002) Sufren degradación química en presencia de la luz solar, del aire, del calor, de ácidos y álcalis fuertes, generando

oligómeros de naturaleza indeterminada. Son solubles en los disolventes orgánicos comunes. Casi inmiscibles en disolventes polares asociados (agua, amoníaco).

Son aceptados como sustancias seguras (GRAS) por la Agencia de Drogas y Alimentos de E.E.U.U. (FDA) (Code of Federal Regulations, 2003). La actividad antimicrobiana dependerá de la constitución propia de cada aceite esencial. Según algunos autores, los aceites esenciales que provocan una mayor inhibición del crecimiento en las bacterias Gram positivas (*Staphylococcus áureus* y *Bacillus cereus*) que en las Gram negativas (*Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli*) es debido a la presencia de pared celular que evita la difusión de compuestos hidrófobos en las bacterias Gram Negativas. (Pelissari. F. et al. 2009)

Los apósitos de biopolímeros para la curación de heridas deben proteger la piel dañada de la penetración de bacterias. (Valencia-Gómez. L. et al. 2016) Los *films* que llevan en su composición gelatina se convierten en un medio de cultivo muy efectivo para el desarrollo de microorganismos, ya que esta es una proteína de alto valor nutricional, por esta razón proponemos utilizar aceites esenciales para potenciar la actividad antimicrobiana del quitosano.

## **6.3 Parte Experimental**

### **6.3.1 Obtención y caracterización de Gelatina de Pescado**

#### **6.3.1.1 Acondicionamiento del material**

El primer paso consistió en el lavado de la piel de la merluza, pescada en el Golfo San Jorge, con abundante agua para eliminar restos de escamas y carne adherida. Luego, se cortó en trozos pequeños de aproximadamente 1 cm de lado.

### 6.3.1.2 Extracción de gelatina de pescado

Se obtuvo gelatina a partir de piel de merluza por hidrólisis siguiendo la metodología propuesta por Miano y colaboradores. Para esto, el material previamente acondicionado, se sometió a agitación durante 20 min con NaCl 0,5 M en una relación de masa de piel (g): volumen de solución (mL) 1:3. A continuación, se lavó con agua 2 veces. Posteriormente, se sumergió el material en 100 mL de HAc 1 M, agitando 10 min en forma manual y 10 min en agitador magnético durante 1 hora, a temperatura ambiente. Se enjuagó con agua y se dejó en agua durante 2 h a 70°C con agitación magnética. Se filtró y centrifugó aclarando con carbón activado, cuando fue necesario. (Figura 6.2) El producto resultante se mantuvo en estufa a 40°C por 24 h aproximadamente hasta masa constante, para así obtener gelatina deshidratada.



Figura 6.2 Esquema de la extracción de gelatina de pescado a partir de piel de merluza

### 6.3.1.3 Rendimiento Gravimétrico

Se calculó el rendimiento gravimétrico del sólido obtenido según la Ecuación 4.1, detallada en el Capítulo 4, apartado 4.4.2 para el quitosano, utilizando en este caso las masas de gelatina obtenida y de piel de merluza de la que se partió.

#### **6.3.1.4 Caracterización de la gelatina de pescado**

La caracterización de la GP se realizó mediante espectrofotometría infrarroja, comparando el espectro obtenido con el de la gelatina comercial; electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-Page), para evaluar las fracciones encontradas, y determinación del punto isoeléctrico (pI).

Los espectros infrarrojos se registraron de acuerdo al procedimiento ya descrito en el Capítulo 3 de Materiales y Métodos. Se detalla a continuación la electroforesis y la determinación del pI.

#### **6.3.1.5 Electroforesis SDS-PAGE**

Se realizó una electroforesis por la técnica SDS-PAGE para evidenciar las bandas presentes en la GP.

La electroforesis en gel de poliacrilamida se emplea con fines de caracterización cualitativa de proteínas en preparaciones biológicas. Puede emplearse también para estimar los pesos moleculares de subunidades proteicas y para determinar las subunidades que componen las proteínas purificadas. El gel de poliacrilamida presenta una particular estructura, una red tridimensional de fibras y poros obtenida mediante enlaces cruzados de unidades de bisacrilamida bifuncionales con cadenas adyacentes de poliacrilamida. La resolución para un producto determinado se puede optimizar ajustando el tamaño de poro del gel o modificando la concentración de acrilamida. Por lo tanto, las características físicas de un gel determinado dependen de su contenido de acrilamida y de bisacrilamida. Además de la composición del gel, el estado de la molécula constituye un factor importante que afecta la movilidad electroforética. Para las proteínas, la movilidad electroforética depende del pK de los grupos cargados y del tamaño de la molécula; siendo afectada también por la naturaleza, concentración y pH de la solución reguladora, la temperatura, la intensidad del campo eléctrico aplicado y la naturaleza del material del soporte. (Farmacopea Arg) La electroforesis en gel de poliacrilamida con desnaturalización, empleando dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) es la técnica electroforética más empleada para la evaluación de la calidad de productos proteicos. De modo general, la electroforesis analítica de proteínas se realiza en geles de poliacrilamida

dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). El SDS es un detergente aniónico fuerte que desnaturaliza la proteína en combinación con el  $\beta$ -mercaptoetanol, que rompe los puentes disulfuro, y el calor. (Se calienta a 95 °C) Los polipéptidos desnaturalizados se unen al SDS, adquieren carga negativa y presentan una relación carga/masa constante, independientemente del tipo de proteína considerada. Las moléculas de SDS cubren la molécula en una relación aproximada de una molécula de SDS cada dos aminoácidos, de tal manera de desnaturalizar la proteína y recubrirla con cargas negativas. Esto hace que todas las proteínas queden con la misma relación carga- masa. Si se dispone esto en una electroforesis normal como, por ejemplo, en una tira de nitrocelulosa, las proteínas no se separan; pero al ponerlas en un gel poroso como es el PAGE, con distintos tamaños de poro, hace que las proteínas más chicas avancen más que las más grandes, logrando así separar las proteínas por su masa molecular aparente. Esto permite su análisis y caracterización. (Stryer. L. et al. 2013)

Para el análisis de los resultados, el método de tinción de proteínas más empleado, es la Tinción con Coomassie, con un nivel de detección del orden de 1 a 10 g de proteína por banda. (Preparación del colorante: 1,25 g de Azul brillante de Coomassie R-250 en 1 litro de una mezcla de agua, metanol y ácido acético glacial (5:4:1).

Debido a que la separación ocurre en función del tamaño (masa molecular aparente), se determina la masa molecular aparente de las proteínas, comparando la movilidad electroforética ( $R_f$ ) de la proteína de masa molecular ( $M_w$ ) desconocida con la de proteínas de referencia de masa molecular conocida. (Maldonado-Alconada. A. 2001) Para ello se miden las distancias de migración de cada banda proteica (marcadores y muestras). Se divide la distancia de migración de cada proteína por la distancia de migración del indicador. Las distancias de migración normalizadas así obtenidas se denominan movilidades relativas de las proteínas (relativas al frente del indicador) y, por convención, se expresan como  $R_f$ . Se construye una curva con  $R_f$  versus el logaritmo de las masas moleculares relativas de las proteínas patrón, se obtiene así una recta. La  $M_w$  se puede determinar por regresión lineal o por interpolación a partir de las curvas obtenidas; los valores obtenidos para las muestras se deben encontrar contenidos en la parte lineal del gráfico.

La *Figura 6.3* muestra un esquema de la técnica utilizada. (Berg. J. et al. 2015) Para ello, se preparó una solución de GP al 0,1% p/v, de la cual se extrajeron 20  $\mu$ L. La electroforesis se realizó utilizando un equipo Mini PROTEAN IV de BioRad. Se trabajó con la técnica de geles discontinuos, en la cual se utilizan dos tipos de geles, el primero llamado de siembra, estaqueo o *stacking*, es un gel de baja concentración (4%) de poro grande, preparado en buffer Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, permitiendo que la muestra se concentre y llegue al segundo gel llamado separador, corrida o *running*, preparado con buffer Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. La muestra fue mezclada con 10  $\mu$ L de buffer de siembra y calentada a 95 °C por 5 minutos. El buffer de siembra está constituido por: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 10% glicerol. El glicerol con los aniones Cl<sup>-</sup> dan el efecto de arrastre, que junto con los poros muy grandes del gel concentrador, hace que las proteínas lleguen todas juntas al segundo gel que es el que separa. (10% SDS; 0,5% azul de bromofenol; 50  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoetanol) El colorante se usa para ver el frente de la corrida y el  $\beta$ -mercaptoetanol rompe los puentes disulfuros, entonces si la proteína esta formada por dos cadenas unidas por puentes disulfuros, se verán las cadenas separadas, no la proteína completa.

La corrida fue realizada a 60V a temperatura ambiente durante 90 min aproximadamente. Las bandas de proteínas fueron teñidas con una solución de azul de coomassie R-250 y desteñidas en una solución de metanol: agua: ácido acético (5:4:1, v/v/v). La Masa Molecular Aparente de las bandas fue determinada con 3  $\mu$ L de los siguientes marcadores de masa molecular (Broad Range de Bio-Rad): apiotinina (6.246 kDa), lisozima (17.086 kDa), inhibidor tripsina (27.236 kDa), anhidrasa carbónica (34.435 kDa), ovoalbúmina (48.044 kDa), BSA (74.141 kDa), betagalactosidasa (114.317 kDa) y miosina (201.237 kDa). Este ensayo se realizó en colaboración con el laboratorio de Química Biológica de la FCNyCS de la UNPSJB a cargo de la Dra. Cecilia Crovetto.

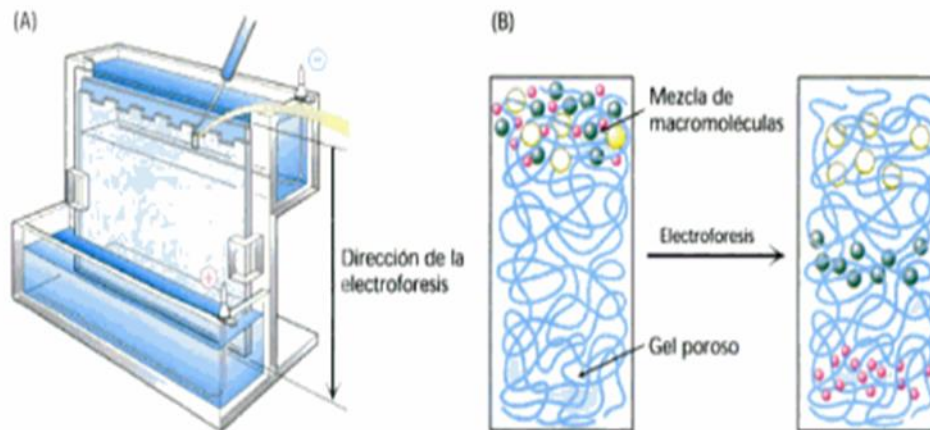


Figura 6.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Aparato de electroforesis en gel. Los complejos proteína-SDS cargados negativamente migran en dirección al ánodo, en la parte inferior del gel. (B) La acción de tamizado de un gel poroso de poliacrilamida separa las proteínas de acuerdo con su tamaño, moviéndose más rápido las más pequeñas

(Maldonado-Alconada. A. et al. 2001)

### 6.3.1.6 Determinación del Punto Isoeléctrico (PI)

Para la determinación del pI de la GP se prepararon 50 mL de una solución acuosa de GP 0,5% p/v y se añadieron dos gotas de NaOH 0,5 M. Luego de agitar hasta su total disolución se midió su pH. Se completó una bureta de 25 mL con HAc 0,5 M y se midió el pH de la solución cada 0,1 mL de ácido agregado, observándose la aparición de turbidez. La prueba se realizó por triplicado y se graficó el pH en función del volumen de ácido añadido. A partir del gráfico se calculó la primera derivada que corresponde al pI de la GP.

### 6.3.2 Films Qhl-GP-Ce<sup>+3</sup> y Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup>

Se prepararon *films* siguiendo la metodología *cold casting*, a partir de una solución ácida de Qhl y solución acuosa de GP, en proporción 70/30 v/v con agregado de Ce<sup>+3</sup> (sal nitrato de Cerio) como agente antifúngico, en proporción 0,625% en masa respecto del quitosano. El mismo *film* se preparó con los polímeros comerciales. Los *films* se denominaron: Qhl-GP-Ce<sup>+3</sup> y Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup>. En la *Tabla 6.1* se detallan las condiciones experimentales usadas.

Tabla 6.1 Condiciones experimentales en la preparación de films de quitosano-gelatina

Muestra	Qhc	Qhl	GP	GEA	Nitrato de Cerio <sup>+3</sup>
	(mL)	(mL)	(mL)	(mL)	(g)
Qhc-GEA-Ce <sup>+3</sup>	4,2			1,8	0,0125
Qhl-GP-Ce <sup>+3</sup>		4,2	1,8		0,0125

### 6.3.3 Films Qhl-GP-Gen-Ce<sup>+3</sup> y Qhc-GEA-Gen-Ce<sup>+3</sup>

Se prepararon *films*, por *cold casting*, con Gen; este fue el agente entrecruzante seleccionado en el capítulo anterior como el más adecuado para el uso propuesto. Se trabajó a partir de una solución ácida de Qhl (2% m/v en HAc) y una solución acuosa de GP (5% m/v), en proporción 70%/20% v/v. Se agregó como entrecruzante Gen en solución acuosa (5% v/v) en una proporción del 10% en peso respecto al quitosano. Se adicionó Ce<sup>+3</sup> como agente antifúngico. Se preparó el mismo *film* a partir de los polímeros comerciales. Los *films* se denominaron: Qhl-GP-Gen-Ce<sup>+3</sup> y Qhc-GEA-Gen-Ce<sup>+3</sup>. En la *Tabla 6.2* se detallan las condiciones de preparación de los soportes poliméricos preparados.

Tabla 6.2 Condiciones de preparación de films Qhc-GEA-Gen-Ce<sup>+3</sup> y Qhl-GP-Gen-Ce<sup>+3</sup>

Muestra	Qhc (mL)	Qhl (mL)	GEA (mL)	GP (mL)	Gen (mL)	Nitrato de Cerio <sup>+3</sup> (g)
Qhc-GEA-Gen-Ce <sup>+3</sup>	4,2		1,2		0,42	0,0125
Qhl-GP-Gen-Ce <sup>+3</sup>		4,2		1,2	0,42	0,0125

### 6.3.4 Films Qhl-AT-Ce<sup>+3</sup>, Qhc-AT-Ce<sup>+3</sup>, GP-ATox-Ce<sup>+3</sup> y GEA-ATox-Ce<sup>+3</sup>

Se prepararon soluciones de Qhc y Qhl según la metodología ya explicada y se le adicionó, a cada una, el AT, sólido, sin oxidar en una proporción del 10% en peso respecto al quitosano y Ce<sup>+3</sup> como antifúngico.

Por otro lado, se prepararon soluciones al 5% p/v de gelatina de pescado (GP) en buffer carbonato pH 9 y se adicionó el AT, con oxidación, en una proporción del 10% en peso respecto a la GP y Ce<sup>+3</sup> como antifúngico. Se dejaron las soluciones por 2 h a 30°C con agitación constante. Con la misma metodología se preparó el *film* a partir de gelatina comercial A (GEA).

Se centrifugaron las soluciones y los sobrenadantes se plaquearon en caja de Petri de 6 mm de diámetro. Se dejaron secar a temperatura ambiente durante 48 h. Las muestras se identificaron de la siguiente manera: Qhl-AT-Ce<sup>+3</sup> – Qhc-AT-Ce<sup>+3</sup> - GP-ATox-Ce<sup>+3</sup> – GEA-ATox-Ce<sup>+3</sup>. (Tabla 6.3)

Tabla 6.3 Condiciones de preparación de films con ácido tánico y Ce<sup>+3</sup>

Muestra	Qhl (mL)	GP (mL)	AT (g)	Nitrato de Ce <sup>+3</sup> (g)
Qhl-AT-Ce <sup>+3</sup>	6		0,12	0,125
Qhc-AT-Ce <sup>+3</sup>	6		0,12	0,125
GP-AT ox-Ce <sup>+3</sup>		6	0,30	0,125
GEA-AT ox-Ce <sup>+3</sup>		6	0,30	0,125

### 6.3.4.1 Oxidación del AT

Para aquellos sistemas en los cuales se llevó a cabo la oxidación del AT, se dejó burbujear oxígeno durante la reacción de entrecruzamiento. Para llevar a cabo la oxidación se utilizó un dispositivo preparado en el laboratorio, el cual consta de un globo inflado con oxígeno envasado unido a un Erlenmeyer que contiene el sistema de reacción con buzo de agitación. (Figura 6.4a)

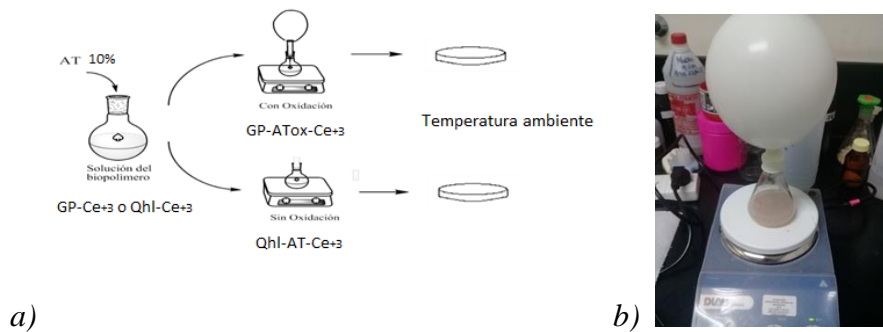


Figura 6.4 a: Esquema de agregado de AT con y sin oxidación, b: fotografía del sistema armado en el laboratorio para oxidar el AT)

### 6.3.4.2 Films con variación de la concentración de AT

Se probó variar la concentración de reticulante (AT) en los *films* de polímeros naturales para observar si esto modifica algunas propiedades como el Índice de hinchamiento de los *films*. Se agregó una concentración de 1-5 y 10 % en peso de AT a las mezclas de Qhl en HAc y a la de GP en agua para formar los *films*. Luego se agregó nitrato de cerio como antifúngico.

### 6.3.5 Films con incorporación de aceites esenciales comerciales como agentes antifúngicos

Se utilizaron aceites esenciales comerciales de canela (CA) y clavo de olor (CL). (Aceites esenciales de Hierbas y Esencias, obtenidos por destilación por arrastre de vapor, 100% puros, sin aditivos ni conservantes) Se probó su capacidad antifúngica, suplantando al nitrato de cerio utilizado anteriormente. La finalidad fue buscar compuestos de origen

natural que acompañen la formación de los biomateriales buscados siguiendo la idea de química verde utilizada. Se agregó el aceite esencial disuelto en la misma mezcla de reacción de los polímeros.

#### 6.3.5.1 *Films* GEA-ATox-CA y GEA-AToc-CL

Se prepararon *films* de GEA por la metodología ya explicada en apartados anteriores. El agregado de AT fue en una proporción del 10% en peso respecto de la GEA. El AT fue oxidado durante la reacción. Luego se agregó el aceite esencial. Se agitaron las soluciones a 30°C durante 4 h. Se centrifugaron las soluciones y se plaquearon en placa de Petri de 6 mm. Finalmente, se dejaron secar los *films* a temperatura ambiente 48 h.

#### 6.3.5.2 *Films* Qhc-AT-CA y Qhc-AT-CL

Se prepararon *films* de Qhc por la metodología ya explicada en apartados anteriores. En el caso del Qhc, se agregó el AT sólido sin oxidar, en proporción del 10% en peso respecto al polímero base y luego se agregó el aceite esencial. Se agitaron las soluciones a 30°C durante 4 h. Se centrifugaron las soluciones y se plaquearon en placa de Petri de 6 mm. Finalmente, se dejaron secar los *films* a temperatura ambiente 48 h.

Los sistemas se detallan en la *Tabla 6.4*.

*Tabla 6.4 Condiciones de preparación de films Qhc-TA-aceite esencial y GEA-TAox-aceite esencial*

Muestra	Qhc (mL)	GEA (mL)	TA (g)	CA (mL)	CL (mL)
Qhc-AT10%-CA	6		0,12	0,75	
Qhc-AT10%-Cl	6		0,12		0,75
GEA-AT10%ox-CA		6	0,30	0,75	
GEA-AT10%ox-Cl		6	0,30		0,75

Todos los *films* fueron caracterizados por espectroscopía FTIR. Se les midió además la permeabilidad al vapor de agua, índice de hinchamiento y propiedades mecánicas.

### **6.3.6 Ensayos de la capacidad antimicrobiana de los *films***

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los *films* se utilizó el método de difusión en disco (Antibiograma). Los microorganismos seleccionados para este ensayo fueron cepas ATCC: *Escherichia Coli* ATCC 25922 (Gram-) y *Staphylococcus áureus* ATCC 25923 (Gram +). Estos fueron cultivados de 24 a 48 horas hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Se prepararon suspensiones bacterianas de turbidez estandarizada, en buffer fosfato, y se sembraron por agotamiento de superficie en agar de Muller-Hinton. A continuación, se colocaron sobre el medio, discos de los *films* de prueba. Estos fueron los *films* de Qhc; Qhc-AT-CA; Qhc-AT-CL; GEA-ATox-CL. Se incubaron las placas 24 h a temperatura ambiente y se evaluaron los resultados midiendo los halos de inhibición hallados.

Los ensayos microbiológicos fueron realizados en los Laboratorios de Microbiología (Bioq. Hilda Nieres), Hemoderivados, UNC.

## **6.4 Resultados y Discusión**

### **6.4.1 Obtención y caracterización de la GP**

La piel de merluza, una vez acondicionada, presentó una coloración gris oscura. La gelatina obtenida presentó una coloración transparente a levemente amarillenta. (*Figura 6.5*)

El color de las gelatinas comerciales, generalmente varía de amarillo pálido a ámbar oscuro y es considerado un atributo comercial importante. La turbidez de las soluciones de gelatina y el color oscuro, son comúnmente causados por sustancias contaminantes que no se eliminan durante el procedimiento de extracción. De todos modos, el color final de la gelatina depende de varios factores, incluidos la especie de pez, materia prima y las condiciones de extracción previamente mencionadas. (Alfaro. A. 2008) Aunque el color

de la gelatina depende de la materia prima, este no influye en otras propiedades funcionales de la misma. (Huang. C. et al. 2010)

Según la Farmacopea Argentina Vol I, las características generales que debe presentar la gelatina son: láminas, escamas o fragmentos, o polvo grueso a fino, ligeramente amarillo o ámbar y su intensidad de color varía según el tamaño de partícula.

En virtud de esto último se podría decir que la gelatina extraída presenta un color aceptable.



*Figura 6.5 Fotografía de la piel de merluza lavada lista para la extracción y gelatina deshidratada obtenida a partir de la misma*

#### **6.4.1.1 Rendimiento Gravimétrico**

Se calculó el rendimiento gravimétrico porcentual por duplicado (RG%) de la GP extraída. (Ecuación 4.1) Los cálculos fueron realizados en base a la masa de piel húmeda utilizada. Se obtuvo un RG % de 15,09. Cuando se habla de rendimientos gravimétricos, se encuentra gran variabilidad en distintos trabajos, que dependen de las propiedades intrínsecas de cada especie de pez, como por ejemplo la edad, contenido de colágeno y la cantidad de componentes solubles presentes en la piel, que a su vez varían con el método de extracción empleado. (Muyonga, J. et al. 2004) Respecto al método utilizado se debe tener en cuenta las pérdidas de material por los sucesivos lavados de la piel y por la hidrólisis incompleta del colágeno durante la extracción. Se han reportado valores para gelatina de piel de merluza (*Merluccius merluccius* L.) de 6,5% (Gómez-Guillén. M. et al. 2002) y 1,5 a 2,8 % (Batista. I. et al. 2004), para gelatina extraída a partir de piel de merluza del cabo (*Merluccius capensis*) con un pretratamiento ácido a 45 y 70°C,

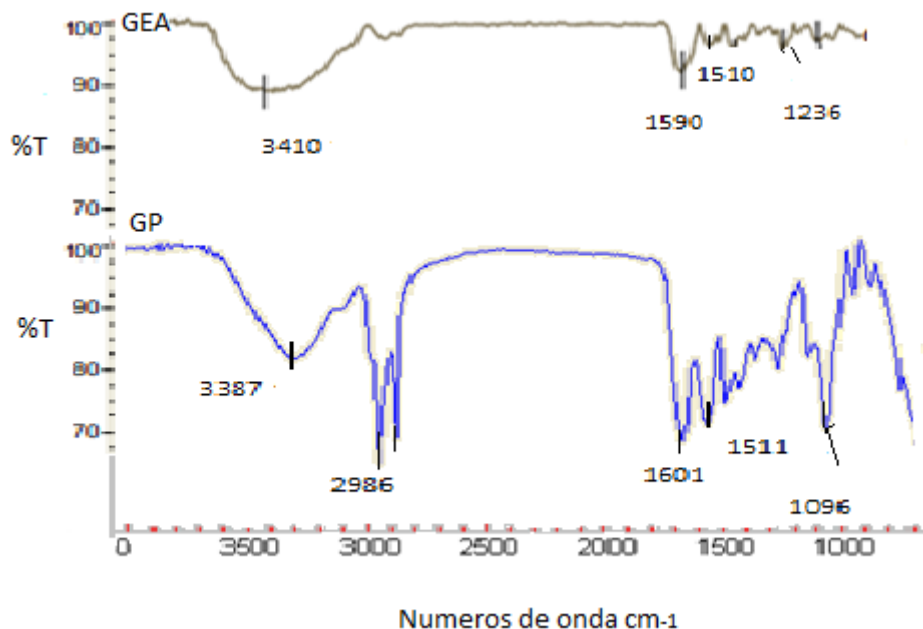
respectivamente. Así se observa que el rendimiento de la gelatina no sólo está influenciado por la especie o tejido del cual es extraída, sino también por el proceso y la temperatura de extracción empleados.

#### 6.4.2 Espectro FTIR

En la *Figura 6.6* se muestra el espectro FTIR de la GP y de la GEA comercial tipo A. Ambos espectros presentan un perfil de bandas principales semejantes entre sí. Las bandas de GEA fueron descritas en el capítulo 5. (*Figura 5.2*).

Al analizar el espectro FTIR de la GP, se observaron las siguientes diferencias en la intensidad relativa de algunas de las bandas: la banda correspondiente al estiramiento del enlace N-H levemente corrida hacia números de onda menores, la banda amida I y amida II levemente corridas hacia números de onda mayores y amida III corrida notablemente hacia número de onda menor. La banda que aparece a  $2986\text{ cm}^{-1}$ , marcada en GP, podría deberse a bandas de tensión de enlace C-H. (Velandia Cabra. J. 2017)

Estas diferencias podrían atribuirse a diferencias en la composición de aminoácidos de ambas gelatinas.

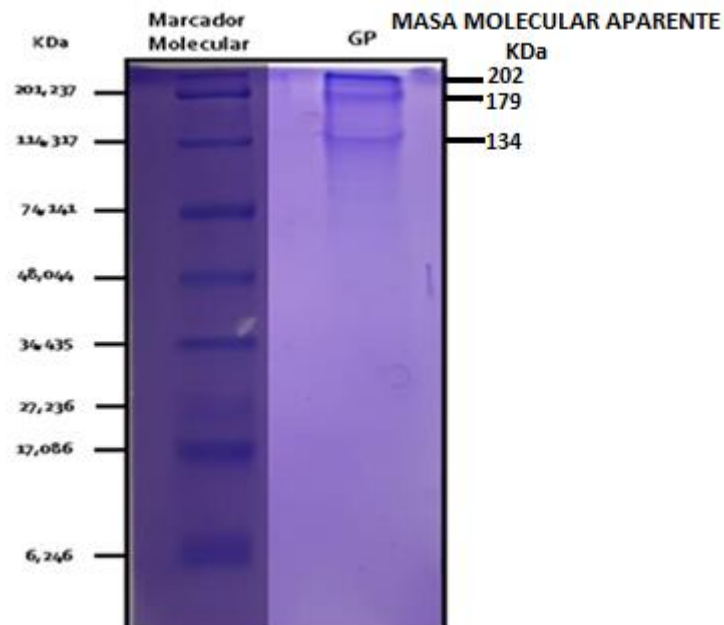


*Figura 6.6 Espectro FTIR de GP y GEA*

### 6.4.3 Electroforesis SDS-PAGE

El perfil electroforético (SDS-PAGE) de la GP se muestra en la *Figura 6.7*. Se determinaron los Rf de la proteína problema con los RF de las proteínas patrón y de la curva log de masa molecular relativa vrs, Rf se determinaron las masas moleculares aparentes en la GP. Se hallaron masas moleculares aparentes de aproximadamente 179 y 202 kDa compatibles con la fracción  $\beta$  de colágeno, y una banda más débil de peso molecular aparente de aproximadamente 134 kDa, compatible con la fracción  $\alpha$  del colágeno.

Distribuciones de bandas de alta masa molar también fueron observadas en perfiles electroforéticos de gelatina extraída de peces de agua fría, como bacalao (*Gadus morhua*) y merluza (*Merluccius merluccius, L.*) (Gómez-Guillén. M. et al. 2002), merluza azul (*Macruronus novaezelandiae*). (Mohtar. N. et al. 2010) y abadejo de Alaska. (*Theragra chalcogramma*). (Zhou. P. et al. 2006) Al obtenerse bandas con altos pesos moleculares y ninguna banda por debajo de los 100 KDa, esto indicaría que el colágeno extraído de las pieles de merluza (un pez de agua fría) no sufriría una elevada desnaturalización, indicando la efectividad del proceso de extracción.



*Figura 6.7* Perfil electroforético (SDS-PAGE) de gelatina de pescado (GP) con relación al marcador molecular

#### 6.4.4 Determinación del Punto Isoeléctrico (pI)

Se utilizó el método alcalino para la extracción de la gelatina de la piel de merluza y se obtuvo un punto isoelectrico de 5.2. (Figura 6.8)

Dependiendo del método de pretratamiento de la piel de pescado se obtienen dos tipos de gelatina con características diferentes. La gelatina tipo A es producida por un pretratamiento ácido con un pI de 6-9 y la gelatina tipo B con un pretratamiento alcalino presenta un pI de 5 aproximadamente (Karim. A. et al. 2009)

La proteína posee una carga neta cero en el punto isoelectrico (pI); a este pH los polianfolitos no migran cuando se sitúan en un campo eléctrico externo como ocurre, por ejemplo, en la electroforesis. El punto isoelectrico (pI) de una proteína se puede estimar basándose en los aminoácidos que la constituyen. Si en la molécula se encuentran de modo predominante grupos de tipo ácido, el punto isoelectrico (pI) será bastante bajo; en cambio, si los grupos predominantes son de tipo básico, el pI será más alto.

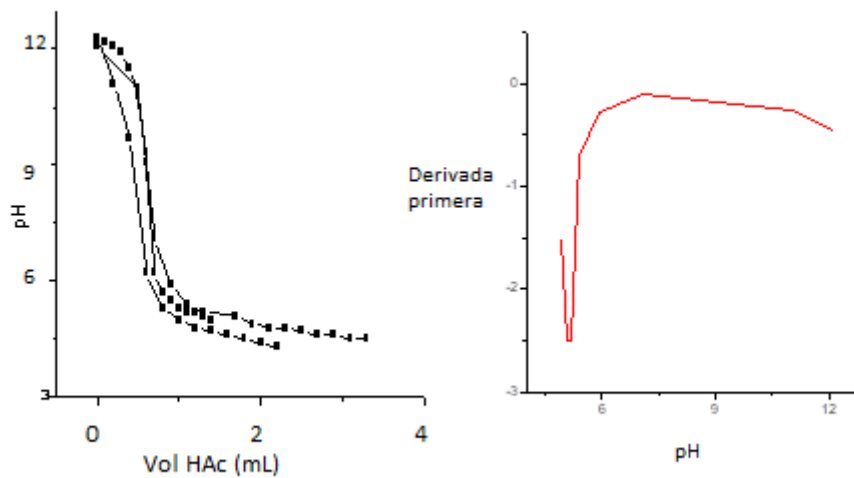


Figura 6.8 Izquierda: Gráfica de pH vs Volumen de HAc añadido. Derecha: Gráfica de la primera derivada para la determinación del pI

## 6.4.5 Films preparados

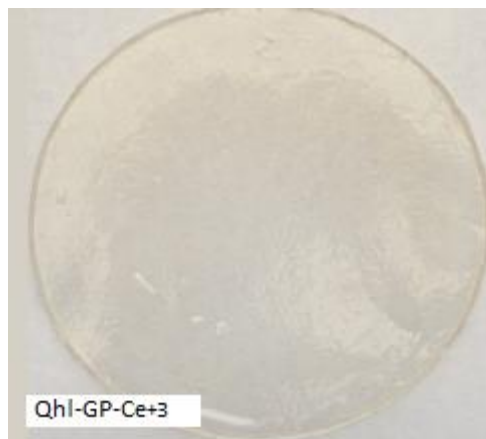
### 6.4.5.1 Films Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup> y Qhl-GP-Ce<sup>+3</sup>

Los *films* Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup> y Qhl-GP-Ce<sup>+3</sup>, fueron uniformes, homogéneos y transparentes. Los *films* de Qhl-GP-Ce<sup>+3</sup> presentaron un espesor de 104 a 140  $\mu\text{m}$  y los de Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup> de 105 a 130  $\mu\text{m}$ .

Se retiraron de la placa con facilidad, y presentaron buena flexibilidad. Los *films* no mostraron contaminación fúngica ni bacteriana. El *film* preparado a partir de Qhl se muestra en la *Figura 6.9*.

Los *films* de GP son rígidos. El agregado de Qhl a la GP disminuye la rigidez de estos *films*. Otros autores mostraron que el agregado de plastificantes, como sorbitol, les proporciona una mejora a los *films* de gelatina, en sus propiedades mecánicas. (Rivero. S. et al.2010)

Al poco tiempo de estar almacenados, los *films* presentaron, a simple vista, desarrollo de microorganismos. Esto se debe a que la gelatina es una proteína y por lo tanto, un medio de cultivo muy efectivo. Se ha demostrado que el agregado de Ce<sup>+3</sup> a un biopolímero le confiere actividad antibacteriana. (Huang. C. et al. 2010) (Zhou. P. et al. 2006)



*Figura 6.9* Films preparados Qhl-GP-Ce<sup>+3</sup>

#### 6.4.5.2 *Films* con agregado de entrecruzante, Qhc-GEA-Gen-Ce<sup>+3</sup> y Qhl-GP-Gen-Ce<sup>+3</sup>

Los *films* con agregado de Gen como entrecruzante fueron uniformes, homogéneos y presentaron un espesor desde 105 a 135  $\mu\text{m}$ . Presentaron una coloración azulada intensa propia de las películas entrecruzadas con Gen. (Aldana. A. et al. 2012) Se pudieron retirar de la placa con facilidad, pero resultaron más quebradizos, que los que no tenían entrecruzante Gen.

#### 6.4.5.3 *Films* de Qhl-AT-Ce<sup>+3</sup>/ Qhc-AT-Ce<sup>+3</sup> / GP-ATox-Ce<sup>+3</sup> / GEA-ATox-Ce<sup>+3</sup>

Los *films* de quitosano con AT se prepararon sin oxidar el AT. De bibliografía, se sabe que las uniones de tipo covalentes entre Qhc y AT oxidado no pueden establecerse debido a que la acidez de la solución deja los grupos amino de Qhc protonados impidiendo de esta manera su unión con el anillo fenólico de la quinona. (Božič. M. et al. 2012) Los *films* Qhc- AToxidado resultan menos estables en comparación con los de Qhc-AT sin oxidar debido a que las uniones puente hidrógeno disminuyen debido a la disminución de los grupos -OH del AT como consecuencia de su oxidación.

Las propiedades de la gelatina deshidratada dependen de la historia térmica de obtención. Los *films* de gelatina pueden prepararse por cold o hot casting. El estado conformacional de los *films* de gelatina difiere cuando el disolvente se evapora a temperatura ambiente (*cold-cast film*) o a temperatura superior a 35°C (*hot-cast film*). A temperatura ambiente se obtiene una estructura helicoidal. A temperatura superior, se obtiene la conformación de un ovillo o bobina, que son típicamente más frágiles y quebradizas. Por tal motivo, se eligió la metodología de *cold-casting* para la obtención de los *films* de gelatina. (Peña. C. et al. 2010)

Todos los *films* con agregado de AT como entrecruzante fueron uniformes, homogéneos y presentaron un espesor desde 98-115  $\mu\text{m}$ . Su coloración fue opaca. Fueron retirados de la placa con facilidad presentando buena flexibilidad.

En la reacción de oxidación del AT, el resto del difenol pasa a una ortoquinona, esta reacción puede ocurrir enzimáticamente como en tejidos vegetales, o por oxígeno. La quinona forma un dímero en una reacción secundaria o reacciona con grupo amino de

cadena lateral de polipéptidos (GEA-GP) para formar enlaces C-N covalentes con el anillo fenólico, con regeneración de la hidroquinona. Este último puede ser reoxidado y se une a un segundo grupo amino, dando como resultado un reticulado. Alternativamente dos quinonas, llevando cada una una cadena, pueden dimerizar, produciendo también una reticulación. (Figura 6.10) (Nowzari. F. et al. 2013) (Strauss. G. et al 2004)

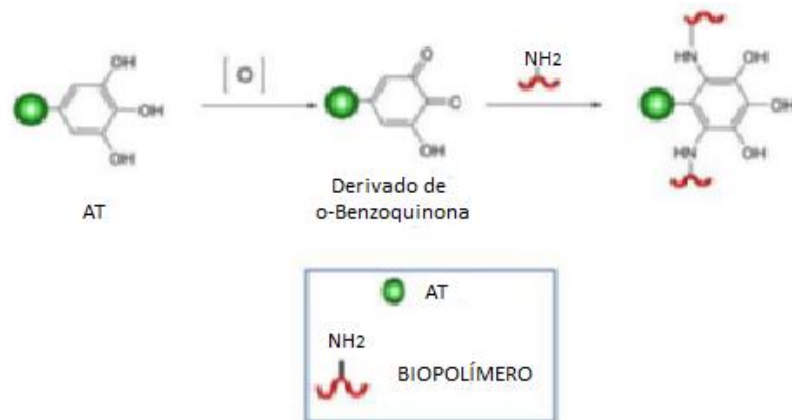


Figura 6.10 Esquema de Reacción de reticulación entre AT y gelatina

El agregado de  $Ce^{+3}$ , como ya fue expuesto anteriormente, brinda protección contra la invasión y proliferación de hongos y bacterias. Esto, permitiría, la utilización de los films obtenidos como apósitos para uso biomédico.

#### 6.4.5.4 Films con incorporación de aceites esenciales comerciales como agentes antifúngicos (Qhc-AT-CA; Qhc-AT-CL; GEA-ATox-CL y GEA-ATox-CA)

Para evitar la contaminación por microorganismos en los *films* preparados se incorporó a la matriz aceites esenciales de canela y clavo de olor.

Los *films* de quitosano entrecruzados con AT y con aceites esenciales fueron transparentes con leve brillo, y presentaron un espesor de 120 a 138  $\mu m$  y los de GEA-ATox con clavo de olor de 115 a 128  $\mu m$ , fueron opacos; ambos fueron uniformes, homogéneos y se retiraron de la placa con facilidad presentando buena flexibilidad.

Los *films* de GEA-ATox formulados con adición de aceite esencial de clavo de olor (CL) fueron uniformes, homogéneos y delgados presentando un espesor desde 115 a 128  $\mu\text{m}$ . Los materiales resultaron opacos. Fueron retirados de la placa con facilidad presentando buena flexibilidad.

Los *films* de GEA-ATox formulados con adición de aceite esencial de canela (CA) fueron quebradizos por lo que fueron descartados.

Algunos autores han reportado que los *films* con agregado de aceites esenciales presentan cambios en la transparencia debido a la presencia de una fase dispersa y al debilitamiento de la asociación de cadenas. (Bonilla. J. et al. 2011)

Respecto al brillo, en otros trabajos, se ha encontrado que, en general existe un descenso del mismo, tanto mayor cuanto mayor es el contenido de aceites esenciales en la matriz. (Atares. L. et al. 2010) El descenso del brillo se relaciona con el aumento de la rugosidad en la superficie de los *films*. (Bonilla. J. et al. 2013)

## 6.4.6 Caracterización de los *films*

### 6.4.6.1 Espectroscopía FTIR

#### 6.4.6.1.1 *Films* Qhl-GP-Ce<sup>+3</sup>

La naturaleza de las interacciones entre el Qhl y GP se estudió por espectroscopia FTIR, ya que cualquier tipo de interacción de carácter electrostática que pudiera ocurrir entre los componentes del *film*, como la formación de enlaces puente hidrógeno, produciría cambios de frecuencia o intensidad relativa de las bandas de absorción. (Papadimitriou. S. et al. 2008) En la *Figura 6.11* se muestran en forma comparativa los espectros correspondientes a Qhl, GP y al *film* Qhl-GP-Ce<sup>+3</sup>. El espectro del *film* Qhl-GP-Ce<sup>+3</sup> evidencia la presencia de los grupos funcionales correspondientes a ambos polímeros. Sin embargo, se pueden observar algunas diferencias en la región comprendida entre 1700-1400  $\text{cm}^{-1}$  y entre 3500-3000  $\text{cm}^{-1}$ , debido a la interacción entre los grupos funcionales de ambos polímeros. El aumento en la intensidad relativa y el corrimiento de algunas bandas dentro del rango de 1700-1400  $\text{cm}^{-1}$  estarían relacionadas con la vibración de los

grupos amino del Qhl (banda de deformación de  $\text{-NH}_2$  a  $1500\text{ cm}^{-1}$ ) y del grupo carbonilo en el espectro de la GP (bandas de amida I y II). Esto evidencia la presencia de interacciones electrostáticas entre estos grupos. (Pereda. M. et al. 2011) En la región de  $3000$  a  $3500\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a la vibración de los grupos hidroxilo y amino, se observó un pequeño corrimiento de la banda, desplazándose a mayores longitudes de onda, lo que podría estar indicando nuevamente la formación de enlaces puente hidrógeno u otras interacciones en el complejo formado. La formación de un complejo polielectrolítico soluble ha sido reportada por muchos otros autores. (Rivero. S. et al. 2009) (Sionkowska. A. et al. 2004) (Yin. Y. et al. 2005) (Zhuang. H. et al. 2007)

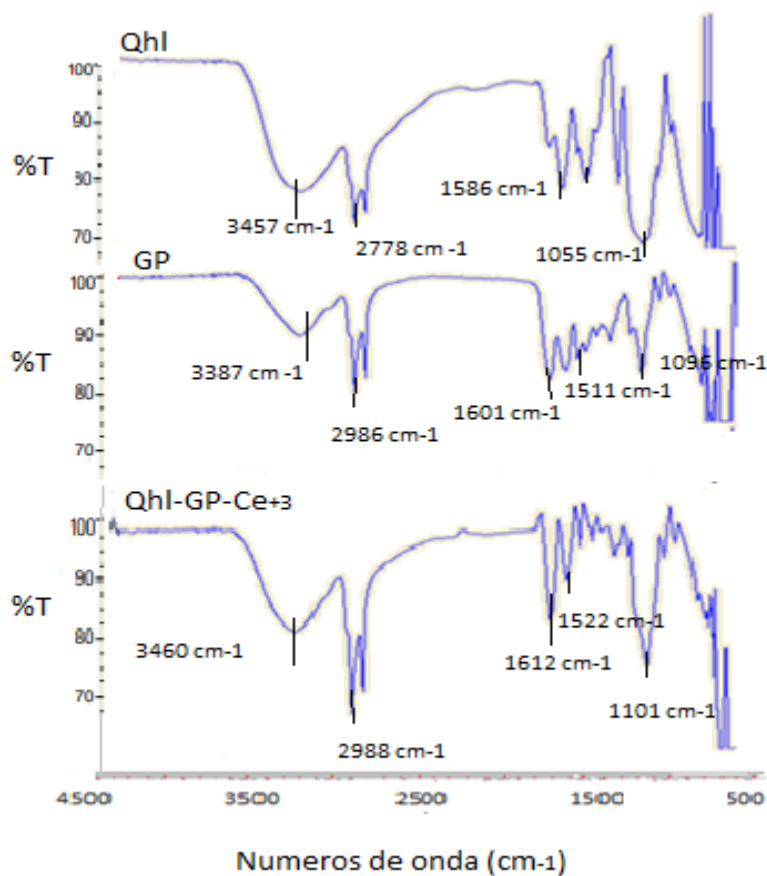


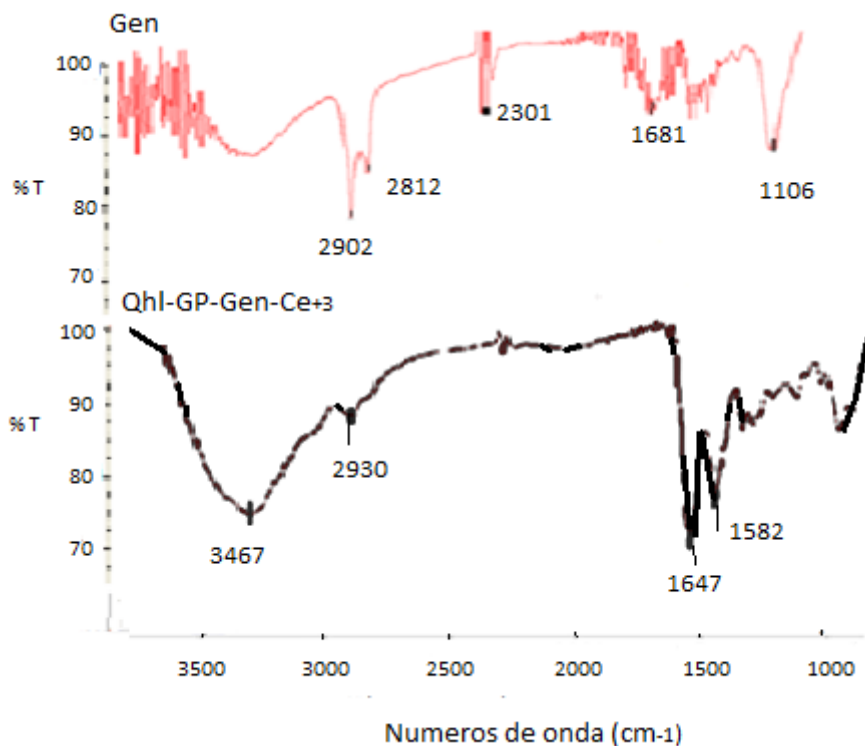
Figura 6.11 FTIR de los films preparados a partir de GP y Qhl.

#### 6.4.6.1.2 Films Qhl-GP-Gen-Ce<sup>3+</sup>

En la *Figura 6.12* puede observarse el espectro de los *films* entrecruzados con Gen. Las señales características del Gen, según la bibliografía, corresponden a la banda de

estiramiento del doble enlace C=O del grupo carbonilo del éster alrededor de  $1600\text{ cm}^{-1}$  y una banda correspondiente al enlace C-O-C alrededor de  $1100\text{ cm}^{-1}$ . (Rivas. A. et al. 2014)

En el espectro del *film* entrecruzado se observa la desaparición de dichas señales características del Gen y la aparición de una señal a  $1647\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a una banda de vibración de C=O de amida, lo cual indica que el entrecruzamiento se llevó a cabo. Se observa también un corrimiento de las señales características de la gelatina, por la presencia del ion  $\text{Ce}^{+3}$ , estos fueron explicados en la *Figura 5.8* para los *films* Qhc-GEA y Qhl-GP.



*Figura 6.12* Espectro FTIR del Gen (rojo) y del *films* de quitosano de langostino, gelatina de pescado con Gen como entrecruzante (negro).

#### 6.4.6.1.3 *Films* Qhc-AT-Ce<sup>+3</sup> y Qhl-AT-Ce<sup>+3</sup>

En la *Figura 6.13* se observan los espectros FTIR para Qhc y *films* de Qhc/Qhl reticulados con AT y Ce<sup>+3</sup> como agente antifúngico.

El espectro de Qhc puro (verde) muestra la banda características a  $3555\text{ cm}^{-1}$  debida a la superposición de las vibraciones de estiramiento de los grupos  $\text{-NH}_2$  y  $\text{-OH}$ . Los picos a  $2926$  y  $1425$ ,  $1241\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las vibraciones simétricas y antisimétricas respectivamente de los grupos  $\text{-CH}_2$  del anillo de carbohidrato. A  $1637\text{ cm}^{-1}$  se observa la señal de estiramiento del grupo  $\text{C=O}$  (la amida I). Se una banda a  $1593\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la flexión del enlace  $\text{-NH}_2$  (amina I) de la 2-aminoglucosa no acetilada y una banda a  $1148\text{ cm}^{-1}$  debida al estiramiento antisimétrico del enlace  $\text{C-O-C}$ .

Para el sistema Qhc-AT-Ce<sup>+3</sup> (rojo) y Qhl-AT-Ce<sup>+3</sup> (azul), la banda correspondiente a la vibración del enlace  $\text{-OH}$  se ensancha luego de la adición del agente entrecruzante debido a la presencia de estos grupos también en el AT y el aumento en los enlaces puente hidrógeno del anillo carbohidrato. Se observan las bandas a  $2926$  y  $2854\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones simétricas del grupo  $\text{CH}_2$ . También se observan diferentes bandas de baja intensidad entre  $2000$  y  $1600\text{ cm}^{-1}$  y debajo de los  $900\text{ cm}^{-1}$  características de anillos aromáticos presentes en el AT.

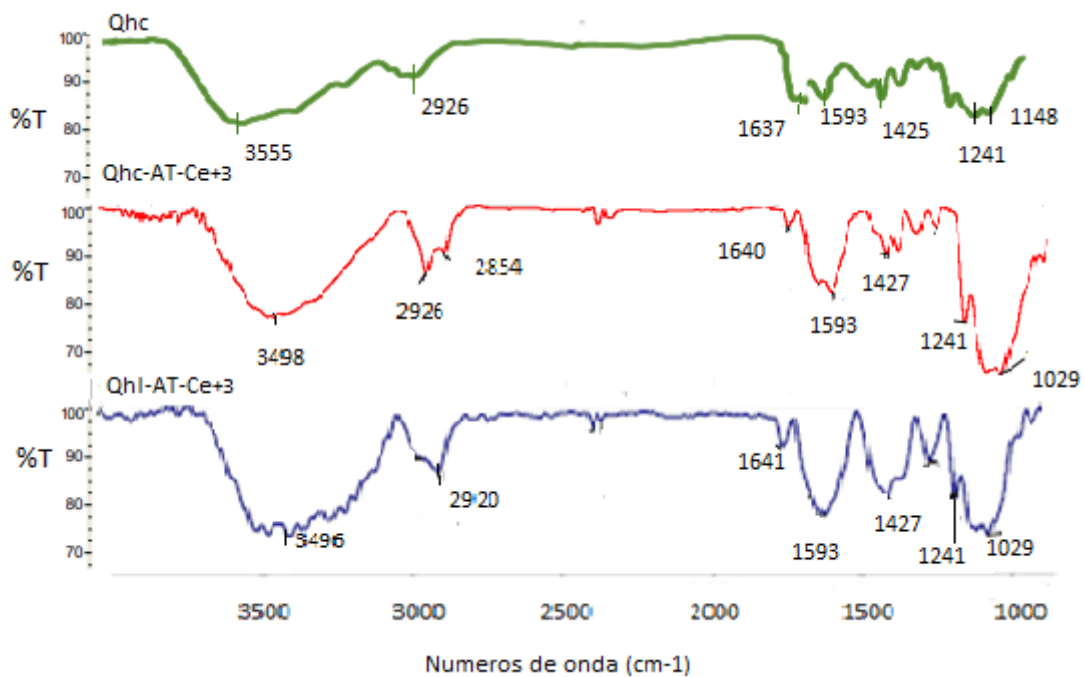


Figura 6.13 Espectros FTIR de Qhc (verde), film Qhl-AT-Ce<sup>+3</sup> (rojo) y film Qhc-AT-Ce<sup>+3</sup> (azul)

#### 6.4.6.1.4 *Films* GEA-ATox-Ce<sup>+3</sup> y GP-ATox-Ce<sup>+3</sup>

En la *Figura 6.14* se observan los espectros FTIR para GEA y *films* de GEA/GP reticulados con AToxidado y Ce<sup>+3</sup> como agente antifúngico.

En el espectro de la GEA pura (gris) se observa una banda ancha entre 3410 cm<sup>-1</sup>, correspondiente a la vibración del enlace NH<sub>2</sub> de los grupos amino, superpuesta con la vibración OH de los grupos hidroxilo del agua, que interaccionan con los grupos amino de la gelatina (enlace hidrógeno). Presenta también las bandas características de amida I a 1590 cm<sup>-1</sup>, debida al estiramiento del grupo C=O, junto a una contribución de las vibraciones de deformación de los enlaces C-N y N-H; amida II alrededor de 1510 cm<sup>-1</sup>, debida al estiramiento C-N y a la deformación N-H; amida III a 1236 cm<sup>-1</sup>.

Los cambios observados en el espectro de los sistemas con agregado de ATox, GEA-ATox-Ce<sup>+3</sup> (azul) y GP-ATox-Ce<sup>+3</sup> (verde), fueron:

- la banda a 3400 cm<sup>-1</sup> correspondiente a los grupos -OH fue mayor después de la adición del AT debido al gran número de tales grupos presentes en el AT y al aumento de los enlaces de hidrógeno.
- Aparece una banda a 1680 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la vibración C=O del carbonilo debido al aumento de estos grupos aportados por el agente entrecruzante.
- Los picos a 2878, 2978 cm<sup>-1</sup> corresponden a las vibraciones simétricas de los grupos -CH<sub>2</sub> del anillo de carbohidrato.
- Aparecen las bandas características de los anillos aromáticos por debajo de los 900 cm<sup>-1</sup> correspondientes al AT.
- Corrimiento de la banda correspondiente a la vibración de enlace N-H de 1590 a 1530 cm<sup>-1</sup> lo que indicaría que el grupo amina está involucrado en un nuevo enlace.

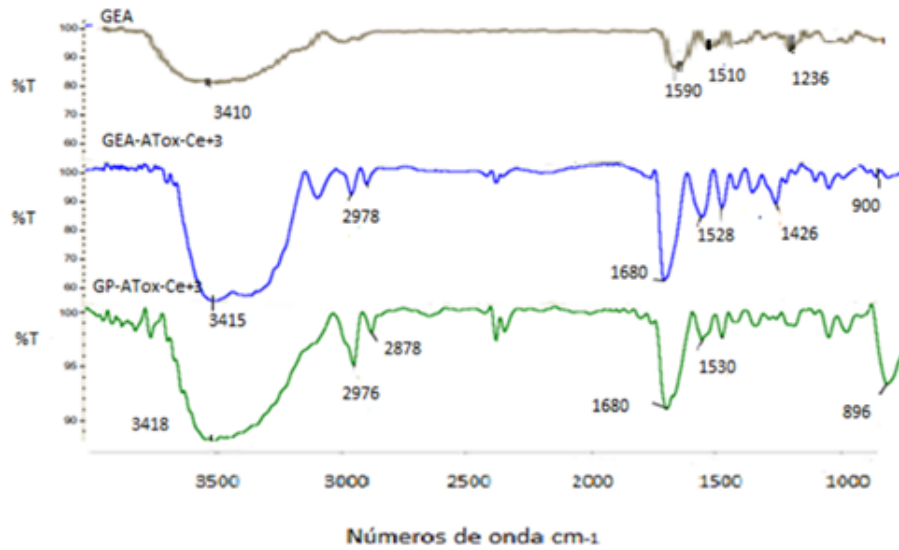


Figura 6.14 Espectros FTIR de GEA (gris), film GEA-ATox-Ce<sup>+3</sup> (azul) y film GP-ATox-Ce<sup>+3</sup> (verde)

Entre gelatina y AT existe entrecruzamiento físico que incluye uniones puente hidrógeno, interacciones iónicas y también interacciones de tipo hidrofóbicas entre el anillo aromático del AT y las cadenas hidrófobas de la gelatina. También existe entrecruzamiento químico bajo condiciones oxidantes. Siendo un agente de entrecruzamiento covalente solo en condiciones de oxidación, las uniones formadas con AT son fuertes y los mejores resultados se obtuvieron en aquellos sistemas gelatina- AT en los que se llevó a cabo la oxidación del entrecruzante.

#### 6.4.6.1.5 Films con incorporación de aceites esenciales comerciales como agentes antifúngicos

La Figura 6.15 muestra los espectros de los films de GEA entrecruzados con AT oxidado y con agregado de aceites esenciales. Los cambios generados como consecuencia del entrecruzamiento con AT fueron discutidos previamente. Al agregar aceite esencial de CL (rojo) se produce un cambio en la región comprendida entre 3000 y 3600 cm<sup>-1</sup>, teniendo la banda una intensidad menor, lo que indicaría una disminución en los enlaces puente hidrógeno. La aparición de una banda a 1600 cm<sup>-1</sup>, característica del enlace C = C

presente en la molécula de eugenol, evidencia la presencia de CL, ya que es uno de sus principales componentes. Los *films* con aceite esencial de CA no se formaron.

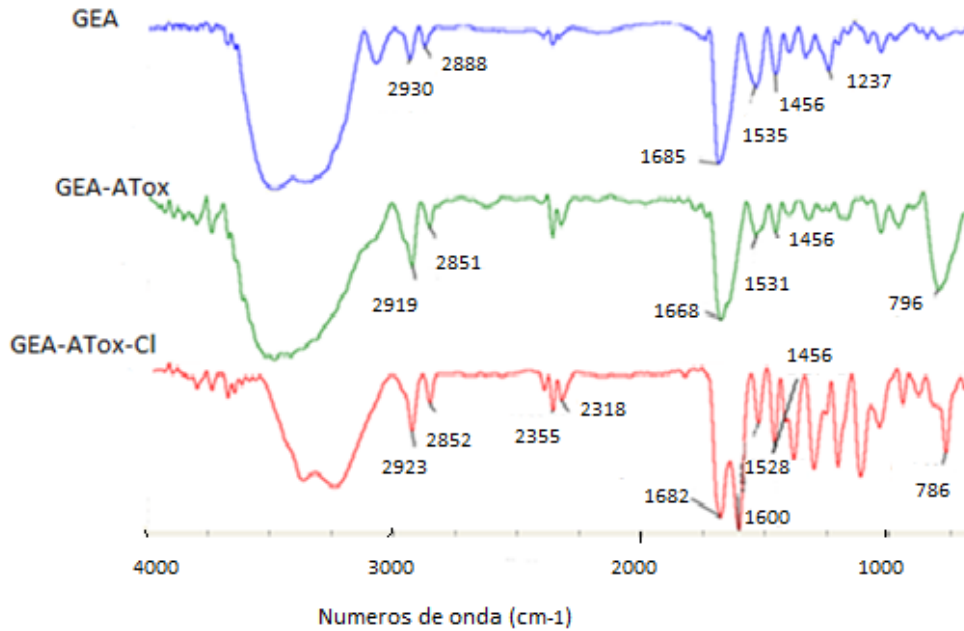


Figura 6.15 Espectros FTIR de GEA (azul), GEA-ATox (verde) y GEA-ATox con aceite esencial de CL (rojo)

Por otro lado, en la *Figura 6.16* se presentan los espectros FTIR correspondientes a los *films* preparados a partir de quitosano comercial, AT como entrecruzante y con el agregado de aceites esenciales.

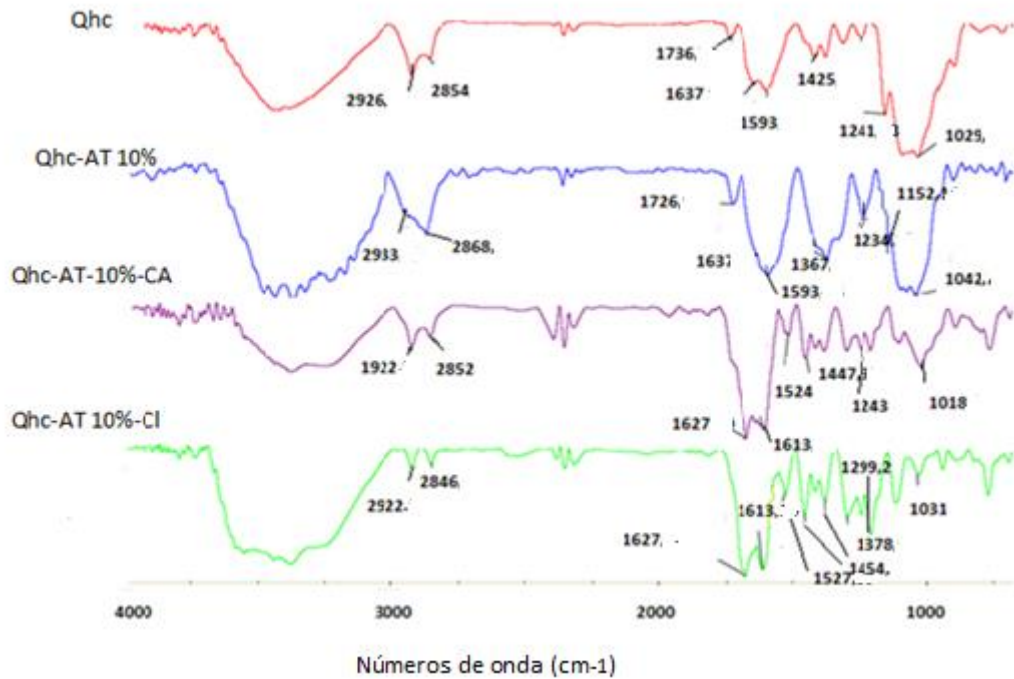


Figura 6.16 Espectros FTIR de Qhc puro, Qhc-AT, Qhc-AT con aceite esencial de CA y con aceite esencial de CL

El aceite esencial de canela (CA) está compuesto principalmente por cinamaldehído (60,41%), linalol (6,46%), orto – metoxicinamaldehído (3,63%), b-cariofileno (3,5%), 1,8 - cineol (3,32%) y eugenol (3,19%). (Ojagh. S. et al. 2010) El cinamaldehído ( $C_6H_5CH=CHCHO$ ), posee una estructura que se caracteriza por la presencia de un anillo bencénico monosustituido, un grupo funcional aldehído y un enlace doble conjugado, que es el responsable de proporcionarle al compuesto una geometría plana. Una de las reacciones típicas de los aldehídos es la adición nucleofílica. (Porrás. G. et al. 2009) Así, los grupos amino libres de la cadena de quitosano pueden reaccionar con el grupo carbonilo del cinamaldehído. (Figura 6.17)

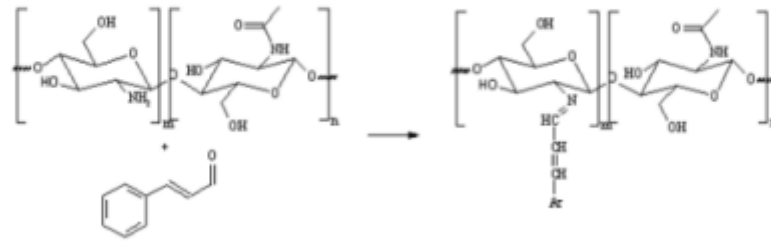


Figura 6.17 Formación de base de Schiff entre quitosano y cinamaldehído.

Al agregar el aceite de canela, a los *films* de GEA-ATox, estos resultaron quebradizos por lo que fueron descartados. Probablemente, no se establecen los enlaces covalentes entre los componentes en cuestión debido a que los grupos aminos presentes en la GEA ya se encuentran formando uniones covalentes con el AT.

En el caso del aceite esencial de clavo de olor (CL), su principal componente es eugenol (90%) en cuya estructura presenta un grupo hidroxilo, capaz de interactuar por enlace puente hidrógeno con los biopolímeros. (Aguilar. G. et al. 2013)

Dada la estabilidad que presentan los sistemas GEA-ATox-CL, Qhc-AT-CL y Qhc-AT-CA se consideran *films* con propiedades óptimas.

#### 6.4.6.2 Permeabilidad al Vapor de Agua (WVP)

Las propiedades de barrera son fundamentales en cuanto a la protección de la herida frente a factores ambientales y el contacto con otras superficies. Estas incluyen la permeabilidad al vapor de agua y a otros gases. (Ramos. O. et al. 2012)

Un apósito para heridas, ideal, debería controlar la pérdida de agua evaporada desde la herida a una velocidad óptima. La permeabilidad al vapor de agua de un apósito para heridas debería prevenir tanto la deshidratación excesiva como la acumulación de exudado, teniendo en cuenta esto un valor de velocidad de transmisión al vapor de agua recomendado para dichos apósitos es de 2500 g.m<sup>-2</sup> por día. (Valencia-Gómez. L. et al. 2016)

Usualmente, la permeación del vapor de agua a través de un *film* hidrofílico, está relacionado con la solubilidad y la difusión de las moléculas de agua en la matriz polimérica.

En la *Tabla 6.5* se detallan los resultados obtenidos para la permeabilidad al vapor de agua y la velocidad de permeación al vapor de agua para los diferentes *films*.

*Tabla 6.5 Valores de WVP y WVTR de todos los films preparados*

<i>Film</i>	WVP ( $\times 10^{-12}$ g. $m^{-1}$ . $S^{-1}$ . $Pa^{-1}$ )	WVTR (g. $m^{-2}$ . $dia^{-1}$ )
Qhc-GEA-Ce <sup>+3</sup>	125	760
Qhl-GP-Ce <sup>+3</sup>	170	815,6
Qhc-GEA-Gen-Ce <sup>+3</sup>	136	741
Qhl-GP-Gen-Ce <sup>+3</sup>	395	502,7
Qhc-AT-Ce <sup>+3</sup>	200	1215
Qhl-AT-Ce <sup>+3</sup>	237,5	1340
GEA-ATox-Ce <sup>+3</sup>	315	1158
GP-ATox-Ce <sup>+3</sup>	320	1283
Qhc-AT-CA	171	1216
Qhc-AT-Cl	112	1158
GEA-ATox-CA	No se formó <i>film</i>	No se formó <i>film</i>
GEA-ATox-Cl	938	1447

#### 6.4.6.2.1 Influencia de la GP en la permeabilidad

Se encontraron valores de permeabilidad al vapor de agua mayores para los *films* preparados a partir de la GP, tanto para los entrecruzados con Gen o AT como para los sin entrecruzar. La razón de esta diferencia podría deberse a que la difusión de las moléculas de agua estaría facilitada, en estos *films*, aumentando los valores de WVP. Esta diferencia podría atribuirse a la composición aminoacídica de la GP.

Según otros autores, el quitosano puro forma *films* con escasa barrera a la humedad debido a que es altamente hidrofílico, su resistencia al agua es menor que la de los *films* basados en proteínas y por ello alcanza un valor de permeabilidad mayor que la gelatina. (Rivero.

S. et al. 2009) Los valores de WVP para Qhc fueron de  $510 \times 10^{-12} \text{ g. m}^{-1} \cdot \text{S}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$  y para GEA pura en el orden de  $300 \times 10^{-12} \text{ g. m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ )

Analizando los resultados obtenidos, se podría decir que los valores de permeabilidad fueron similares, tanto para los *films* de quitosano o gelatina comerciales, como para Qhl y GP extraídos a partir de fuentes naturales fue similares.

#### **6.4.6.2.2 Influencia del entrecruzamiento en la permeabilidad**

Los *films* de Qhl-Ce<sup>+3</sup>, antes de agregarles entrecruzante tuvieron valores de WVP de  $648 \times 10^{-12} \text{ g. m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ .

El agregado de Gen, produjo una disminución de la permeabilidad respecto al *films* de Qhl-Ce<sup>+3</sup> lo que indicaría que al entrecruzar el polímero la matriz se vuelve más compacta y disminuye la permeabilidad al vapor de agua.

La incorporación de AT, como entrecruzante, a la matriz polimérica del quitosano disminuyó la permeabilidad al vapor de agua, lo que indicaría una compactación de la matriz del mismo.

La GP modificada con AT exhibe un comportamiento semejante al descrito para el Qhl, esto es, la adición del agente entrecruzante provoca una disminución en el valor de permeabilidad al vapor de agua como consecuencia de la reticulación.

#### **6.4.6.2.3 Influencia de agregado de Aceites Esenciales en la permeabilidad**

Por otro lado, el agregado de aceites esenciales produjo una disminución de la permeabilidad al vapor de agua para los *films* de quitosano. Esto podría ser causado por el aumento de la hidrofobicidad del sistema y de la discontinuidad en la red polimérica para la transferencia de masa. Las moléculas de agua deben difundir principalmente por la fase polimérica continua hidrofílica, donde la presencia de gotitas de aceite representa discontinuidades que causan un aumento efectivo del factor de tortuosidad para la transferencia de agua en la matriz. La incorporación de aceites esenciales conlleva cambios en la estructura de los *films*, con alteración en sus propiedades físicas,

dependiendo de la naturaleza del aceite esencial, la cantidad adicionada o las condiciones de secado. El proceso de secado de los *films* tiene influencia directa en la organización de los componentes de la matriz y, en el caso de *films* con lípidos, ocurren fenómenos de floculación y coalescencia, que afectan en gran medida a las características finales de los *films*. (Campos. C. et al. 2011) En el caso de los aceites esenciales, una parte del aceite se vaporiza durante el secado del *film*, lo que implica una menor efectividad. (Sánchez-González. L. et al. 2011) (Pelissari. F. et al. 2009) (Mahdi. S. et al. 20105)

No obstante, en el caso de la GEA, la incorporación del aceite esencial incrementa el valor de permeabilidad, esto coincide con el espectro de infrarrojo para este sistema que revela una disminución de enlaces puente de hidrógeno, con lo cual disminuyen las fuerzas intermoleculares permitiendo el libre paso del agua. En otros estudios se observó un aumento de la permeabilidad al vapor de agua con la adición de aceites, lo cual se explicó en base a interacciones específicas de los componentes del aceite con la matriz polimérica y el plastificante. (Souza. A. et al. 2013) (Perdones. A. et al. 2014) Los valores obtenidos de permeabilidad permiten decir que las películas obtenidas son adecuadas para su uso como apósitos y se podría proponer su uso en aplicaciones biomédicas.

#### 6.4.6.3 Índice de Hinchamiento

La medición del índice de hinchamiento de *films* poliméricos a diferentes pH y el conocimiento de su comportamiento es esencial para la aplicación exitosa de los mismos. En general, las películas de biopolímeros producidas a partir de carbohidratos o proteínas inicialmente se hinchan cuando absorben agua, lo que resulta en cambios en su estructura. (Gethin. G. 2007)

Los resultados obtenidos mostraron que el comportamiento de hinchamiento de los *films* cambió dependiendo de su composición y del entrecruzante utilizado. El experimento se llevó a cabo a pH 4 y 7, simulando valores de pH extremos durante el exudado de una herida. El hinchamiento de los *films* fue medido durante 7 horas, pero se dejaron en contacto con cada uno de los buffers por una semana, en los casos que fue posible. Este tiempo es importante considerando el uso del *film* como apósito para heridas. (Aldana. A. et al. 2012)

En la *Tabla 6.6* Se detallan los valores obtenidos para cada sistema.

Tabla 6.6 Valores de Índice de Hinchamiento de equilibrio de todos los sistemas formados a diferentes pH

<i>Film</i>	IH %	IH %
Composición	pH 4	pH 7
Qhc-GEA-Ce <sup>+3</sup>	634,91	458,95
Qhl-GP-Ce <sup>+3</sup>	468,86	186,86
Qhc-GEA-Gen-Ce <sup>+3</sup>	349,18	144,88
Qhl-GP-Gen-Ce <sup>+3</sup>	308,85	74,26
Qhc-AT-Ce <sup>+3</sup>	205	97
Qhl-AT-Ce <sup>+3</sup>	183,25	67,35
GEA-ATox-Ce <sup>+3</sup>	149,62	124,12
GP-ATox-Ce <sup>+3</sup>	114,25	99
Qhc-AT-CA	27,6	36,8
Qhc-AT-Cl	20,6	39,8
GEA-ATox-Cl	64,75	99,4
GEA-ATox-CA	No se formó <i>film</i>	No se formó <i>film</i>

En la *Figura 6.18* se observan todos los valores obtenidos de IH para los *films* preparados. El *film* de *Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup>*, a pH 4, mostró un valor de Índice de hinchamiento de 634,91 %. Este alto incremento observado, en el hinchamiento a esta pH, cuando el quitosano utilizado es el comercial, puede deberse a una mayor cantidad de grupos amino libres en la cadena de quitosano comercial. En este medio la mayoría de los grupos NH<sub>2</sub> pertenecientes a Qhc están protonados, lo que ocasiona mayor repulsión electrostática y la consecuente separación de las cadenas del polímero. Por otro lado la gelatina comercial, a pH 4, también presenta los grupos amino protonados, las repulsiones electrostáticas generan separación entre las cadenas y los índices de hinchamiento por lo tanto son mayores que a pH 7.

A pH 7, este *film* de productos comerciales, presenta un valor de IH de 458,95 %.

El *film* de *Qhl-GP-Ce<sup>+3</sup>*, a pH 4, presenta un valor de IH de 468,86 % muy similar al valor del *film* de Qhc con gelatina comercial. A pH 7, el *film* *Qhl-GP-Ce<sup>+3</sup>*, mostró un valor de IH en el equilibrio de 186,86 %. Los valores para este *film*, a pH 7, son notablemente menores que en medio ácido.

Ambos *films* fueron estables a ambos valores de pH durante todo el tiempo de medición.

En los *films* con incorporación de Gen, los valores alcanzados para el índice de hinchamiento son notablemente menores que sin el entrecruzante, tanto en los preparados a partir de quitosano y gelatina comercial como para los de quitosano y gelatina extraídos de productos naturales y a ambos valores de pH. Se puede atribuir esto a la formación de una red covalentemente entrecruzada a través de los grupos amino de la gelatina y quitosano. La incorporación de  $Ce^{+3}$  a los *films*, por otro lado, produce modificaciones en el hinchamiento. Estudios en complejos de gelatina- $Ce^{+3}$  han demostrado que los grupos carboxilos de la gelatina se coordinan con los iones  $Ce^{+3}$ , comportándose el ión como un agente entrecruzante, además de poseer propiedades antifúngicas. (Huang. Y. et al. 2008)

En los *films* en los que se agregó AT como entrecruzante se puede observar una disminución del índice de hinchamiento respecto a los sistemas sin entrecruzante.

En los sistemas con gelatina y AT, esto podría deberse a la formación de una red más entrecruzada, donde la incorporación de AT, mejora la interacción entre las cadenas, siendo una molécula polifuncional y de gran tamaño. Para los *films* de GP entrecruzados, a pH 7 ( $>pI$ ), los grupos carboxilo se encuentran deprotonados (carboxilato), de esta manera las repulsiones electrostáticas generan separación entre las cadenas y en consecuencia aumenta el hinchamiento de los *films*. Por otra parte, a pH 4 ( $<pI$ ), si bien los grupos amino deberían encontrarse protonados generando repulsión también entre ellos, esto no ocurre así debido a que dichos grupos, en su mayoría, se encuentran formando enlaces de tipo covalente con el AT. Este hecho explica que en general, a pH 7, el índice de hinchamiento de los *films* es mayor que a pH 4.

Para los *films* de Qhl, a pH 7, también los valores de hinchamiento son menores al agregar entrecruzante que sin el agregado del mismo. A pH ácido, sin embargo, los enlaces puente hidrógenos intermoleculares se disocian debido a la protonación de los grupos amino y se produce un rápido hinchamiento de la película y en consecuencia su disolución al poco tiempo de contacto con la solución buffer.

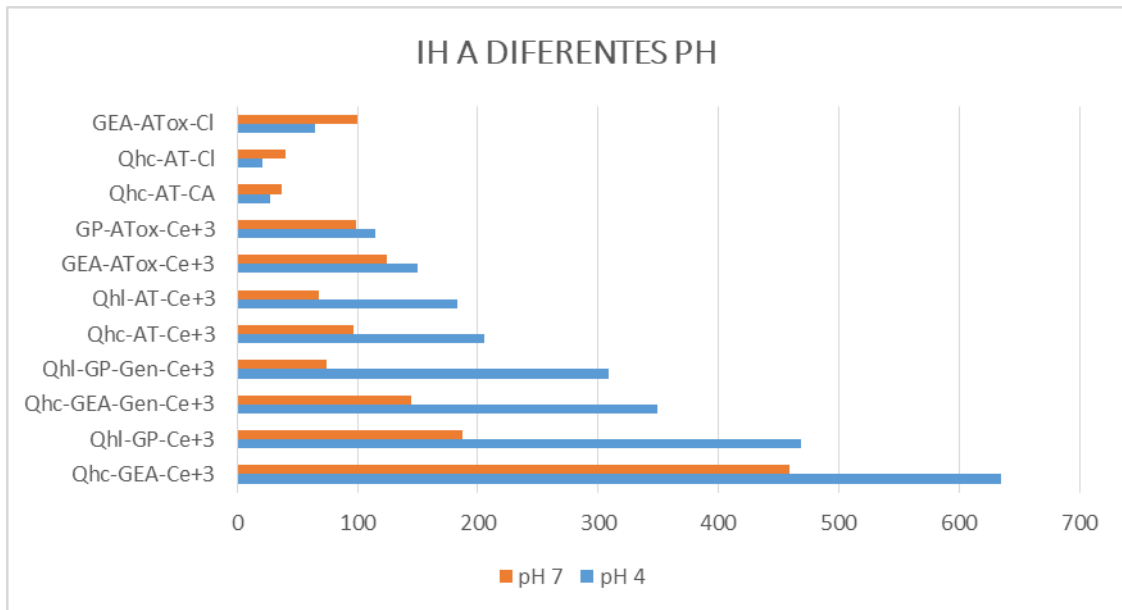


Figura 6.18 Indices de Hinchamiento de todos los sistemas preparados a pH diferentes.

Una particularidad, observada en algunos de los sistemas probados, a bajo pH, es el efecto de hinchamiento-deshinchamiento llamado efecto overshooting (Yin. Y. et al. 2008) el cual se traduce en una curva sigmoidea del índice de hinchamiento. Esto se debería a la presencia de grupos ácido, tanto en la gelatina como en el quitosano, que pueden generar interacciones intermoleculares como fuerzas electrostáticas y puente hidrógeno. A valores de pH bajos, parte de los grupos de la cadena se encuentran protonados (-COOH) y parte se encuentran como iones carboxilatos (-COO<sup>-</sup>), esto da lugar a la competencia de dos procesos opuestos: la repulsión entre las cargas negativas de los grupos carboxilato incrementa el hinchamiento, mientras que la formación de enlaces puente hidrógeno entre los grupos -COOH promueven la expulsión de agua de la red, disminuyendo el hinchamiento. El balance entre estos dos efectos gobierna el comportamiento de hinchamiento de los *films*. (Yin. Y. et al. 2008) En la *Figura 6.19* puede observarse un ejemplo de este efecto.

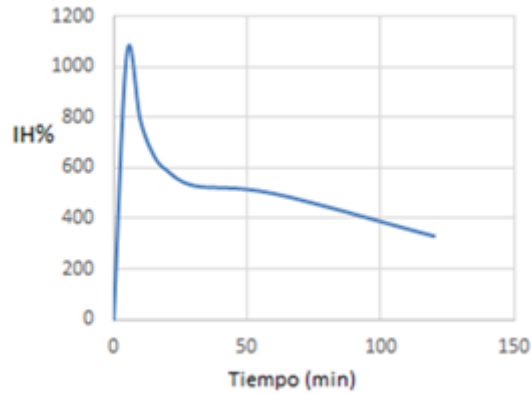


Figura 6.19 Valores de Índice de Hinchamiento del sistema Qhc-GEA-Ce<sup>+3</sup> a pH 4.

#### 6.4.6.3.1 Influencia de la variación de la concentración de AT en el IH

En la *Figura 6.20* se observan las variaciones en el IH % al variar la concentración agregada de AT a las películas de Qhl y de GP.

Los *films* de GP-ATox-Ce<sup>+3</sup> reticulada con distintas concentraciones de AT. En particular la película con una concentración del 1% de AT se disolvió a los 15 minutos y presentó un IH elevado.

Para los *films* de Qhl-AT-Ce<sup>+3</sup>, el índice de hinchamiento de los *films* entrecruzados con distintas concentraciones de entrecruzante, a ambos valores de pH, mostró una tendencia similar a los *films* de gelatina, aunque menos significativa. En estos *films* se verificó que el índice de hinchamiento disminuye ligeramente con el aumento en la concentración de agente entrecruzante.

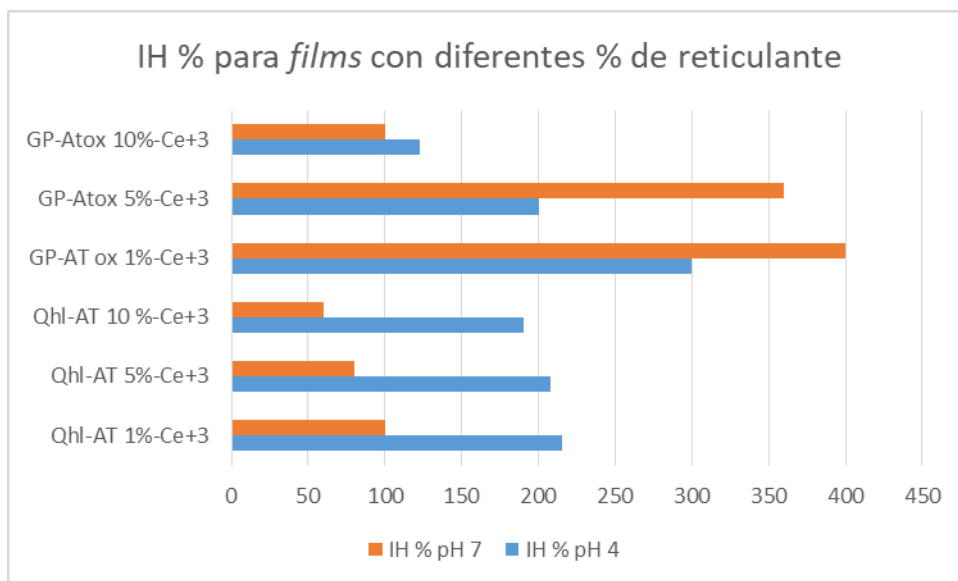


Figura 6.20 Variación del IH % en films de Qhl y GP al variar la concentración de AT agregada.

#### 6.4.6.3.2 Influencia del agregado de aceites esenciales en el IH

Los índices de hinchamiento para los *films* Qhc-AT-CA y Qhc-AT-Cl disminuyeron notablemente respecto a los *films* sin agregado de aceite. Esto podría deberse a un aumento en la hidrofobicidad de la matriz polimérica causada por la incorporación de los aceites esenciales. A pH 4, se observó un valor levemente mayor del índice de hinchamiento cuando el aceite agregado fue de canela en la mezcla de reacción. Los datos analíticos de estudios previos (GC-MS) revelaron que el componente principal de este aceite es cinamaldehído en 60,41%. Este tiene un grupo aldehído funcional que sufriría la reacción típica de adición nucleófila por reactivos de componentes derivados del Qhc. Por otro lado, el componente principal del aceite esencial de clavo de olor es el eugenol (90% - GC.MS), que tiene grupos oxidrilo capaces de mantener interacciones de puente de hidrógeno con biopolímeros. A pH 7 los valores de hinchamiento en los sistemas con ambos aceites muestran un comportamiento inverso, siendo levemente mayor cuando el aceite usado es el de clavo de olor.

Por su parte, el sistema y GEA-ATox-Cl presentó un comportamiento similar de hinchamiento a ambos valores de pH, pero con valores algo menores que el *film* con agregado de  $Ce^{+3}$  y sin aceite esencial. Esto podría deberse a una disminución de los enlaces puente hidrógeno entre las cadenas poliméricas luego de la adición del aceite

esencial y por consiguiente un menor hinchamiento. El *film* con aceite esencial de canela no pudo medirse debido a su disolución.

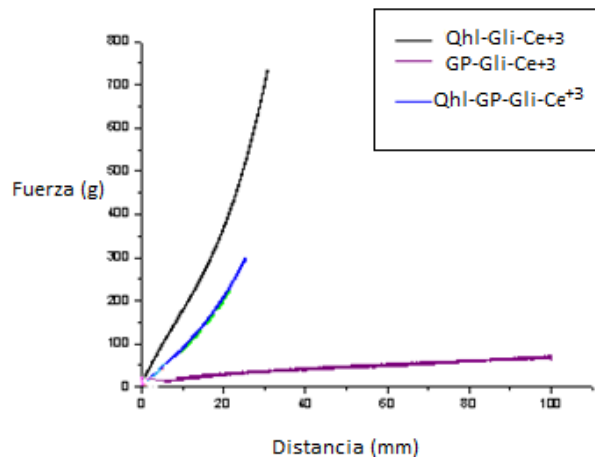
#### 6.4.6.4 Propiedades Mecánicas

La determinación de las propiedades mecánicas del material se realizó mediante un ensayo de tracción el cual permitió definir tres propiedades: Tensión a la rotura, Elongación relativa y Módulo de elasticidad o de Young (García Roldán. A. 2017)

Debido al uso que se les pensaba dar a los *films* de quitosano y gelatina se consideró necesario determinar su comportamiento mecánico.

Se probó realizar medidas con el texturómetro a los *films* y no fue posible debido a la rigidez de los mismos, por lo cual, se procedió a preparar los *films* con el agregado de glicerina; un plastificante de uso común. Se agregó a cada *film* Glicerina (Gli) en una proporción del 1,5 % en peso respecto al peso de quitosano.

En las *Figuras 6.21*, y *6.22* y *6.23* se muestran las curvas de esfuerzo vs deformación, los valores de tensión a la rotura y porcentaje de elongación (EB%) para los *films* Qhl-Gli-Ce<sup>+3</sup>, de GP-Gli-Ce<sup>+3</sup> y Qhl-GP-Gli-Ce<sup>+3</sup>.



*Figura 6.21* Curvas de fuerza (g) en función de la deformación (mm) de los films de Qhl-Gli-Ce<sup>+3</sup>, GP-Gli-Ce<sup>+3</sup> y Qhl-GP-Gli-Ce<sup>+3</sup>.

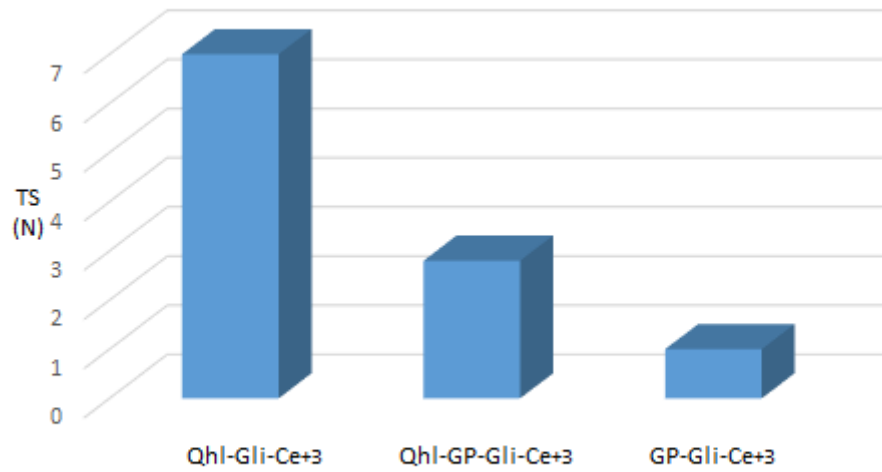


Figura 6.22 Valores de Tensión a la rotura TS (N) para cada film

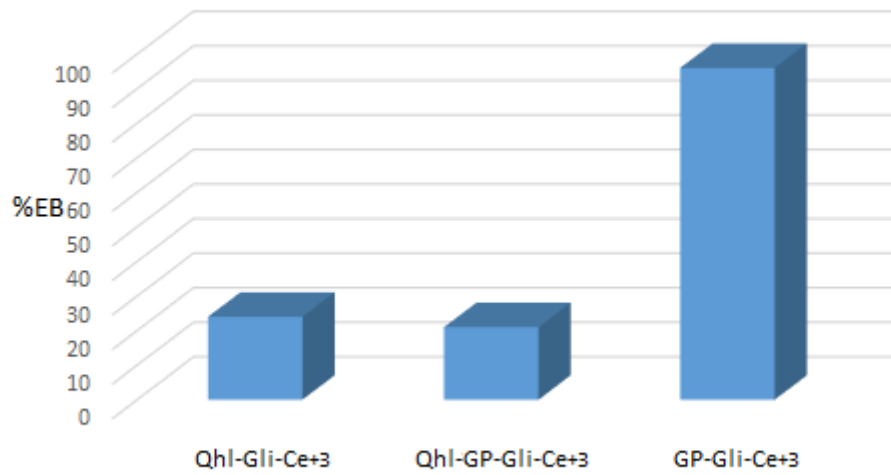


Figura 6.23 Porcentaje de elongación (%EB) para cada film.

El *film* de GP pura exhibió un valor promedio de tensión a la rotura (TS) bajo y un porcentaje de elongación (%EB) alto comparado con los otros *films*. Por el contrario, el *film* de Qhl mostró un valor de TS sustancialmente más alto y un %EB reducido en comparación con el *film* de GP. En cuanto al *film* compuesto por un 30 % de GP y un 70 % de Qhl se observó una disminución en los valores de tensión a la rotura comparados con los valores para el *film* de Qhl, esto puede deberse a que la GP reduciría la capacidad de cristalización del Qhl en la película y, además, el aporte del Gli disminuiría la rigidez molecular de ambos polímeros, reduciendo las fuerzas intermoleculares a lo largo de la cadena polimérica. Puede observarse también una disminución del % EB en el *film* Qhl 70/GP 30 con respecto a los *films* de GP, pero no así en relación al *film* de Qhl, lo que podría indicar que la combinación de los biopolímeros, en estas proporciones, arroja valores intermedios en cuanto a la flexibilidad de los *films* individuales. La comparación con los datos reportados por otros autores es compleja, ya que existe una gran variabilidad en la literatura asociada con las diferentes composiciones de Qhl extraído de diferentes fuentes, grado de acetilación, peso molecular, solubilización, métodos de preparación del *film* y acondicionamiento antes de la prueba. La fuerza y flexibilidad de los *films* combinados cambian en función de la proporción de GP y Qhl en el *film*; por ejemplo, otros autores han reportado que el aumento del contenido de quitosano mejoraría la resistencia mecánica del *film*, pero por otro lado, el contenido de gelatina le conferiría flexibilidad y reduciría la rigidez del mismo. (Mallea. A. 2020)

Por otro lado se midió el esfuerzo en función de la deformación (*Figura 6.24*) que sufre el *film* Qhc-AT-CA sin plastificante y con agregado de diferentes concentraciones de Gli, para evaluar los cambios en la elasticidad. Se encontró que al aumentar el porcentaje de Gli agregado, el *film* se vuelve más elástico.

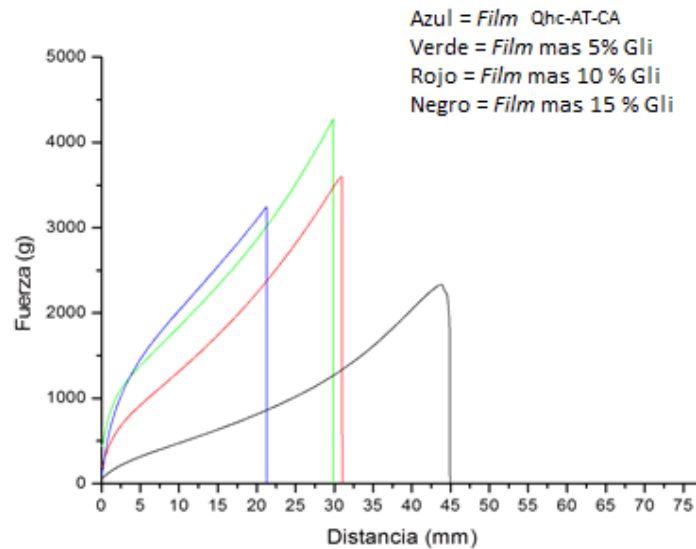


Figura 6.24 Curva Esfuerzo-Deformación para los films Qhc-AT-CA y con distintos % de Gli agregados

Analizando la *Figura 6.24*, se puede observar que el *film* sin plastificante es el más rígido debido a que presenta la mayor resistencia a la deformación. Además, se puede apreciar que se requiere de grandes esfuerzos para lograr deformar la probeta, lo cual permite inferir que el comportamiento mecánico de estas películas corresponde a un material rígido y frágil. Por otro lado, se observa en la curva esfuerzo vs deformación, para los *films*, que al aumentar el % de Gli, el valor del esfuerzo máximo disminuyó considerablemente, mientras que la deformación aumentó notablemente. Todo ello indicaría que el material al estar plastificado reduce su rigidez y aumenta su elasticidad, tal y como lo demuestra el comportamiento mecánico obtenido. Esto podría deberse principalmente a que la inclusión del plastificante interfiere en las interacciones entre las cadenas favoreciendo su movilidad permitiendo aumentar la elongación de las películas y mejorando así su flexibilidad. (Rivero. S. et al. 2009) El glicerol desplazaría al ácido acético del *film*, promoviendo la formación de enlaces de hidrógeno con los grupos amina del Qhc. (Tulande. J. et al. 2014)

Otros autores reportaron resultados similares al plastificar el Qhc con Gli. (Tulande. J. et al. 2014) El agregado de plastificantes como el Gli es una de las alternativas utilizadas para mejorar la flexibilidad y capacidad de procesamiento de los *films* de Qhc,

disminuyendo la resistencia a la tensión, dureza, etc. Esto se debe a que genera cambios en el volumen libre que favorecen la movilidad de las cadenas poliméricas. El Gli ha sido el plastificante más utilizado durante mucho tiempo para diferentes aplicaciones gracias a su buena eficiencia y gran disponibilidad. Por otro lado, la baja exudación y su poder humectante e hidratante, hacen que este sea un plastificante de elección para confección de películas en la preservación de injertos de piel. Este plastificante, además de sus propiedades antivirales y antibacterianas, tiene la propiedad de permitir la rápida y homogénea regeneración de piel sobre quemaduras superficiales. (Khoo. T. et al. 2010)

#### **6.4.6.5 Ensayos de capacidad antimicrobiana de los *films* Qhc, Qhc-AT-CA; Qhc-AT-Cl; GEA-ATox-Cl**

Es sabido que el Qhc posee propiedades antimicrobianas inherentes y es capaz de inhibir el crecimiento de una amplia gama de patógenos, pero debido a la pobre solubilidad del quitosano a alto valor de pH, su aplicación es solamente eficaz en medio ácido. (Raybaudi-Massilia. R. et al. 2009) Por otro lado, la gelatina es una proteína y por tanto un medio de cultivo apto para el desarrollo de microorganismos. La inclusión de aceites esenciales a la matriz de *films* de quitosano y gelatina mejoraría las propiedades antimicrobianas de las películas frente a patógenos. Sin embargo, no se observaron halos de inhibición bacteriana en ninguno de los *films* preparados. (Figura 6.25)

A partir de los resultados cualitativos obtenidos en el ensayo de la actividad antimicrobiana, se podría decir que ninguna de las formulaciones probadas (Qhc, Qhc-AT-CA; Qhc-AT-Cl; GEA-ATox-Cl), mostró un efecto antimicrobiano frente a las cepas seleccionadas a ninguno de los tiempos ensayados.

No se observó contaminación por hongos ambientales de los *films* probados.

Posiblemente los discos de los *films* no tenían un diámetro crítico para evidenciar la actividad antimicrobiana, también la dificultad para adherir estos discos sobre el cultivo preparado podría ser el responsable de los resultados hallados. No obstante, existen reportes de la efectividad de los aceites esenciales para el tratamiento antimicrobiano de las películas basadas en quitosano y gelatina. (Bonilla. J. et al. 2016) (Pires. C. et al.

2013) Por tanto, permanece pendiente el desarrollo de un diseño experimental adecuado para los estudios microbiológicos de los *films*.



Figura 6.25 Resultados de la medición de la actividad antimicrobiana de los *films* probados

## 6.5 Conclusiones parciales

Se logró extraer gelatina de pescado de la piel de merluza con un rendimiento alrededor del 15 % de gelatina en polvo en relación a la masa de piel de merluza húmeda empleada. Esto posibilitaría el potencial aprovechamiento de un subproducto de la industria pesquera de la región usualmente descartado.

La GP presentó buena capacidad filmogénica y pudo incorporarse a los *films* de quitosano, aumentando las características de “sustentable” y “verde” al proceso de obtención de los *films* biocompuestos.

Se sintetizaron y caracterizaron diferentes *films* entrecruzados de quitosano-gelatina, siguiendo una metodología de síntesis sencilla. Se encontró que los *films* combinados presentaron interacciones entre los grupos cargados del quitosano y los de la gelatina, produciendo un complejo polielectrolítico entre ambos biopolímeros. Se evaluó la influencia de diferentes agentes entrecruzantes. El entrecruzamiento de redes poliméricas constituye una alternativa válida para asegurar la estabilidad y la resistencia mecánica del biomaterial.

En el caso de los *films* entrecruzados con genipín, estos materiales fueron estables en medio acuoso a diferentes pH, salvando la principal limitación que tiene el uso de la gelatina como material biomédico, debido a su marcada característica higroscópica. Los *films* mostraron buenas propiedades mecánicas, y sus valores de permeabilidad al vapor de agua fueron semejantes a los de otros biopolímeros entrecruzados. La presencia del ión  $Ce^{+3}$  evitó la contaminación fúngica de los *films*.

El uso de AT para reticular *films* basados en quitosano y gelatina, mostró ser una alternativa para lograr las propiedades adecuadas para el desarrollo de *films* con potenciales aplicaciones biomédicas. Este producto entrecruzante es de origen natural lo que resulta ser una ventaja por sobre el uso del genipín, debido principalmente al elevado costo de este último. Los resultados sugieren que los *biofilms* obtenidos a partir de quitosano y AT podrían ser adecuados para el uso en biomedicina como apósitos para heridas.

En cuanto a las propiedades mecánicas medidas, los *films* obtenidos resultaron óptimos para su utilización en sistemas para el transporte de fármacos. Se obtuvieron *films* transparentes, a partir del uso de las disoluciones de quitosano y gelatina, entrecruzados con ácido tánico y plastificado con glicerol, los cuales presentaron diferentes propiedades mecánicas que fueron fuertemente dependientes del contenido de glicerol. Se encontró que al incrementar dicho porcentaje se mejoraron las propiedades de flexibilidad de los *films* con bajos módulos de elasticidad y resistencia a la tensión en el material. Esta deformación alcanzada por los *films* es directamente proporcional a la alta concentración de glicerol e inversamente proporcional a la resistencia a la tensión.

Respecto al uso de aceites esenciales, se pudo comprobar que los aceites incorporados aparecen como fase dispersa en la matriz polimérica por su falta de miscibilidad. Su presencia dio lugar a una reducción significativa de la permeabilidad al vapor de agua de los *films* de gelatina que era dependiente del tipo de aceite, y un aumento de su transparencia, sin provocar efecto negativo en su comportamiento mecánico, aunque se redujo su brillo. Los *films* con los aceites esenciales no mostraron contaminación por hongos ambientales.

Debido a la estabilidad que presentan los sistemas GEA-ATox-CL, Qhc-AT-CA y Qhc-AT-CL se consideran *films* con propiedades óptimas.

## 6.6 Bibliografía

Aguilar. G & López. M. 2013. Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agente antimicrobiano en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de alimentos*. 7(2): 35-41.

Aldana. A. et al. 2012. Preparation and characterization of chitosan/genipin/poly (N-vinyl-2-pyrrolidone) films for controlled release drugs. *Materials Chemistry and Physics*. 134(1): 317-324.

Aldana. A. et al. 2012. Chitosan films modified selectively on one side with dendritic molecules. *Journal of Materials Chemistry*. 22 (42): 22670-22677.

Alfaro. A. 2008. Otimização das condições de extração e caracterização da gelatina de pele de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*). Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial). Universidade Federal de Pelotas.

Atares. L, Bonilla. J. 2010. Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*. 100: 678-687.

Batista. I. et al. 2004. Gelatin extraction from cape hake and blue shark skin. *Nutrition and food, department for fish quality*.

Berg. J. et al. 2015. *Stryer biochemie*. Springer-Verlag.

Bonilla. J & Sobral. P. 2016. Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. *Food Bioscience*. 16: 17-25.

Bonilla. J, Atares. L. 2011. Physical properties of chitosan-basil essential oil edible films as affected by oil content and homogenization conditions. *Procedia Food Science*. 1: 50-56.

Bonilla. J, Talon. E. 2013. Effect of the incorporation of antioxidants on physicochemical and antioxidant properties of wheat starch-chitosan films. *Journal of Food Engineering*. 118: 271-278.

- Boran. G, Regenstein. J. 2010. Fish gelatin. *Advances in food and nutrition research*. 60: 119-143.
- Božič. M. et al. 2012. Homogeneous and heterogeneous methods for laccase-mediated functionalization of chitosan by tannic acid and quercetin. *Carbohydrate polymers*. 89(3): 854-864.
- Cadby. P. et al. 2002. Fragrance: are they safe. *Flavour Fragr. J.* 17: 472-477.
- Campos. C, Gerschenson. L. 2011. Development of Edible Films and Coating with Antimicrobial Activity. *Food Bioprocess Technol.* 4:849-875.
- Cho. S. et al. 2006. The Effect of Processing Conditions on the Properties of Gelatin from Skate (*Raja Kenojei*) Skins. *Food Hydrocolloid*. 20(6): 810-816.
- Eluk. D. 2014. Modelado reocinético de la maduración de soluciones de gelatina en flujo de corte (Doctoral dissertation).
- García Roldán. A. 2017. Comparación de las propiedades físicas de películas comestibles basadas en proteína aislada de suero lácteo o gelatina de pescado con extractos de hinojo marino incorporados (Tesis de grado). Escuela Técnica superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, España.
- Gethin. G. 2007. The significance of surface pH in chronic wounds. *Wounds uk.* 3(3), 52.
- Gómez. J. et al. 2002. Structural and Physical Properties of Gelatin Extracted from Different Marine Species: A Comparative Study. *Food Hydrocolloid*. 16(1): 25-34.
- Gomez. M. 2012. Optimización del proceso de extracción de gelatina a partir de piel de raya arenera (*dasyatis brevis*). (Tesis Doctoral)
- Gómez-Guillén. M. et al. 2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*. 16(1): 25-34.
- Huang. C. et al. 2010. Preparation and characterization of gelatin/cerium (III) film. *Journal of Rare Earths*. 28(5): 756-759.
- Huang. Y. et al. 2008. Preparation and characterization of novel Ce (III)-gelatin complex. *J. of Applied Polymer Science*. 108(6): 3804-3807.

Khoo. T. et al. 2010. The application of glycerol-preserved skin allograft in the treatment of burn injuries: An analysis based on indications. Published by Elsevier Ltd and ISBI. *Burns*. 36: 897–904.

Kołodziejaska. I. et al. 2008. Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. *Food Chemistry*. 107(2):700–706.

Lacroix. M, Dang. K.D. 2014. Edible Coating and Film Materials: Proteins. En: J. Han. 2° edición. *Innovations in Food Packaging*. Editorial Elsevier. 2: 277-304.

Mahdi. S. et al. 2010. Development and evaluation of a novel biodegradable film made chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*. p: 162- 166.

Maldonado-Alconada. A, Jorin-Novo. J. 2001. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*. Dep. Bioquímica y Biol. Mol. Campus Univ. Rabanales. p: 1-16.

Mallea. A. 2020. Preparación de biopelículas de Quitosano-Gelatina de Pescado para el envasado de alimentos. Trabajo Final de grado de Licenciatura en Química. Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud. Departamento de Química. UNPSJB.

Miano. A. et al. 2014. Influencia de la temperatura y tiempo de extracción en la fuerza de gel y rendimiento de gelatina obtenida a partir de piel de tollo (*Mustelus mento*). *Scientia Agropecuaria*. 5(3): 140-147.

Mohtar. N. et al. 2010. Optimization of gelatin extraction from hoki (*Macrurus novaezelandiae*) skins and measurement of gel strength and SDS–PAGE. *Food Chemistry*. 122(1): 307-313.

Muyonga, J. et al. 2004. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food chemistry*. 85(1): 81-89.

Nowzari. F. et al. 2013. Comparison of chitosan–gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food chemistry*. 141(3): 1667-1672.

Ojagh. S. et al. 2010. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*. 122(1):161-166.

Papadimitriou. S. et al. 2008. Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole. *Carbohydrate Polymers*. 73(1):44-54.

Pelissari. F, Grossmann. M. 2009. Antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*. 25(5): 1372-1381.

Pelissari. F. et al. 2009. Antimicrobial, Mechanical and Barrier Properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 7499-7504.

Peña. C. et al. 2010. Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. *Bioresource technology*. 101(17): 6836-6842.

Perdones. A. et al. 2014. Physical antioxidant and microbial properties of chitosan-cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. *Food Hydrocolloids*. 256-264.

Pereda. M. et al. 2011. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*. 25(5): 1372-1381.

Pires. C. et al. 2013. Hake proteins edible films incorporated with essential oils: physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*. 30(1): 224-231.

Porras. G. et al. 2009. Quitosano n-acilado con cinamaldehído: un potencial bioplaguicida contra agentes patógenos en el campo agrícola. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 10(3): 197-206.

Ramos. O. et al. 2012. Edible Films and Coatings from Whey Proteins: A Review on Formulation, and on Mechanical and Bioactive Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 52: 533-552.

Raybaudi-Massilia. R. et al. 2009. Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. 8(3): 157-180.

Rivas. A & Velásquez. C. 2014. Obtención y caracterización del entrecruzante natural genipina a partir del fruto del caruto (*Genipa americana* L.). Trabajo de Grado para optar al título de Licenciada en Química), Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias Departamento de Química, Laboratorio de Polímeros, Colombia.

- Rivero. S. et al. 2009. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*. 90(4): 531-539.
- Rivero. S. et al. 2009. Películas de gelatina plastificadas con glicerol: propiedades macroscópicas y microestructurales. In III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos-CICyTAC. Córdoba.
- Rivero. S. et al. 2009. Propiedades reológicas, de barrera y mecánicas de películas compuestas de gelatina y quitosano. Facultad de Ciencias Exactas-UNLP. CONICET-CCT La Plata.
- Rivero. S. et al. 2010. Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. I. *Food Science and Emerging Technologies*. (11): 369–375.
- Rose. P. 1987. Gelatine in *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. Wiley & Sons. (3): 488–513.
- Sánchez-González. L. et al. 2011. Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan. *Journal of Food Engineering*. 105: 246 - 253.
- Sionkowska. A. et al. 2004. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials*. 25(5): 795-801.
- Souza. A. et al. 2013. Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. *LWT-Food Science and Technology*. 1-7.
- Strauss. G & Gibson. S. 2004. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids*. 18(1): 81-89.
- Stryer. L. et al. 2013. *Bioquímica, Séptima edición*. Barcelona: Reverté.
- Tulande. J. et al. 2014. Desarrollo de apósitos de quitosano para su posible aplicación en la regeneración de tejido epitelial Primera parte: Caracterización mecánica. *Revista Colombiana de Materiales*. 5: 56-63.
- Valencia-Gómez. L. et al. 2016. Apósitos de polímeros naturales para regeneración de piel. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*. 37(3): 235-249.

Velandia Cabra. J. 2017. Identificación de polímeros por espectroscopía infrarroja. *Revista Ontare.* (5): 115-140.

Yin. Y. et al. 2005. A preliminary study on chitosan/gelatin polyelectrolyte complex formation. *Journal of materials science.* 40(17): 4649-4652

Yin. Y, et al. 2008. Study of the swelling dynamics with overshooting effect of hydrogels based on sodium alginate-g-acrylic acid. *Carbohydrate Polymers.* 71(4): 682-689.

Zhou. P. et al. 2006. Properties of Alaska pollock skin gelatin: a comparison with tilapia and pork skin gelatins. *Journal of Food Science.* 71(6):C313–C321.

Zhuang. H. et al. 2007. In vitro biodegradation and biocompatibility of gelatin/montmorillonite- chitosan intercalated nanocomposite. *Journal of Material Science: Materials in Medicine.*18: 951-957.

## **Capítulo 7 – Estudios de aplicación. Carga y liberación controlada de heparina a partir de *films* de quitosano**

### **7.1 Objetivos**

Sintetizar *films* a partir de quitosano con ácido tánico como entrecruzante, nitrato de cerio como agente antifúngico e incorporarle Heparina como agente cicatrizante de heridas. Evaluar la carga y liberación de Heparina de los soportes. Caracterizar los *films*.

### **7.2 Introducción**

#### **7.2.1 La Piel**

La piel se considera el órgano más grande en la mayoría de los organismos vertebrados. Constituye el 16 % del peso corporal, lo que representa aproximadamente 1,85 m<sup>2</sup> de superficie corporal en una persona de 1,70 m y 70 Kg. (Ramos Quispe. K. 2013) Es la primera barrera de protección y de enlace con el medio ambiente para los seres vivos. Es, también, una de las formas de expresión de sensaciones y enfermedades ya que posee íntima relación con los órganos internos, de tal manera que las enfermedades de estos pueden manifestarse a través de la piel como úlceras y quemaduras. Además de su función protectora ante cambios de temperatura, microorganismos y radiación, ayuda a equilibrar el contenido de agua, electrolitos y temperatura. (García García. J. 2013)

La piel está compuesta por una compleja estructura de tres capas: la epidermis, que es la capa superficial, la dermis que es la capa de piel inmediatamente debajo de la epidermis y la hipodermis. En condiciones normales estas capas tienen la capacidad de auto regeneración.

La epidermis está formada en su mayoría por queratinocitos y proteínas de alta resistencia ante cambios de pH y temperatura, ubicados en la capa más externa de la epidermis denominada estrato córneo; melanocitos, que producen la melanina que protege de los rayos ultravioleta y brinda pigmentación a la piel; células de Langerhans, que forman

parte del sistema inmunológico del cuerpo y las células de Merkel que se enlazan con las terminaciones nerviosas y son responsables del sentido del tacto. (Hachem. J. et al. 2003)

La epidermis tiene una renovación permanente y es reemplazada cada tres semanas aproximadamente.

La dermis o capa intermedia es la que sirve de soporte y da elasticidad a la piel. Está conformada por fibroblastos que sirven para la síntesis de colágeno; macrófagos que realizan la fagocitosis; linfocitos responsables de las reacciones inmunes; mastocitos que están conformados por histamina, heparina y serotonina (compuestos responsables de los procesos inflamatorios) y células plasmáticas. Tanto la epidermis como la dermis tienen una función en común en la regeneración y curación de heridas y de defensa mediante respuestas inflamatorias.

La hipodermis es la capa de anclaje de la piel, fijando sus fibras a la dermis dándole soporte y movilidad a la piel; también se encuentran en ella gran cantidad de terminaciones nerviosas. Está conformada por tejido adiposo que cumple las funciones de aislante, como reserva de energía y amortiguador de impactos.

Otros elementos importantes de la piel son: el pelo que cumple una función protectora; las glándulas sebáceas que ayudan a lubricar la piel y a preservar su cubierta hidrolípida; y las glándulas sudoríparas que ayudan a equilibrar la temperatura corporal. (Merino. J. et al. 2012)

Las laceraciones por enfermedades y las heridas por quemaduras resultan difíciles de sanar porque implican pérdida de piel, exponiendo a los órganos internos a la pérdida de humedad y contaminación aeróbica que conducen a infecciones y sepsis. En la *Figura 7.1* se muestra un esquema de la estructura de la piel.

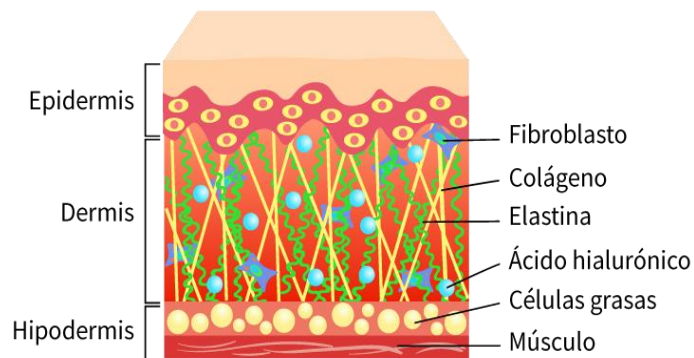


Figura 7.1 Estructura de un corte de piel

(Ruiz-Carrascosa. J & Ruiz-Villaverde. R. 2015)

## 7.2.2 Descripción general de una herida-quemadura

La compleja estructura de la piel, en ocasiones puede perder su integridad debido a trastornos genéticos, traumas agudos, heridas crónicas, intervenciones quirúrgicas y quemaduras. Estas lesiones dan luego lugar a reacciones locales y generales cuya gravedad está dada por su extensión y profundidad. (Holmes. J. et al. 2006) La herida se define como una lesión del cuerpo que, de forma característica, consiste en una laceración o infracción de una membrana, con el daño de los tejidos subyacentes. (Merriam-Webster Dictionary) Las heridas son un problema de salud que afecta a una amplia población de todas las edades y que requieren diferentes intervenciones para asegurar un cuidado óptimo de los pacientes que las presentan. (Beaskoetxea Gómez. P. et al. 2013)

La fisiología de la cicatrización de la herida consta de tres fases: inflamación, proliferación y maduración. Sin embargo, estas tres fases no constituyen episodios aislados. La auténtica complejidad de la cicatrización ha ido cambiando con los conocimientos sobre las interacciones celulares y los mediadores inflamatorios. Las etapas de cicatrización de la herida son secuenciales y simultáneas. (Teller. P. et al. 2009) El resumen general dado a continuación explica los episodios, componentes celulares y mediadores más influyentes en la cicatrización de la herida. La cicatrización empieza cuando se produce una herida. La lesión puede ocurrir por cualquier tipo de fuerzas

mecánicas o térmicas que rompen la piel y dañan el tejido conjuntivo y los vasos. Sigue una hemorragia con exposición del colágeno, el endotelio y las proteínas intra- y extravasculares. Este entorno sirve de estímulo para la hemostasia que inicia la resolución de la lesión. La vasoconstricción y la formación del coágulo hacen que se detenga la hemorragia. La hemostasia se logra por la activación de las plaquetas y la cascada de la coagulación. Con la hemostasia se inicia de inmediato la inflamación, la cual se refleja en los signos físicos de eritema, calor, edema y dolor y representa una dilatación de los vasos sanguíneos, con aumento de su permeabilidad, y el reclutamiento de los leucocitos hacia el foco de lesión. (Merriam-Webster Dictionary)

Es importante determinar si la herida es aguda o crónica, ya que tendrá diferente tratamiento. Esta diferenciación se realiza según el concepto de orden y temporalidad. Orden se refiere a la secuencia de eventos biológicos que ocurren en la reparación de una herida y el concepto de temporalidad se refiere al tiempo que demora el proceso. (López. J. et al. 2010) Una herida aguda es aquella que tiene un tiempo de evolución menor de 30 días y sigue un proceso de reparación ordenado, dentro de un tiempo adecuado, hasta restaurarse la integridad anatómica y funcional del tejido inicialmente lesionado; por ejemplo, heridas limpias luego de procedimientos quirúrgicos o abrasiones superficiales luego de traumas. Las heridas crónicas son aquellas que no siguen un proceso de reparación normal, se estancan en alguna fase de la cicatrización, sin que se restaure la integridad anatómica o funcional del tejido lesionado; por ejemplo, úlceras venosas de los miembros inferiores o úlceras por presión. (Lazaurus. G. 1994)

Por otro lado, las quemaduras tienen su propia definición. Son lesiones en los tejidos orgánicos ocasionados por un agente que produce una variación térmica local. Es el resultado de la interacción de diferentes agentes tanto físicos como químicos (calor, frío, agentes químicos, electricidad o la radiación), con la piel, que puede ir desde una leve afectación del tegumento superficial hasta la destrucción total de los tejidos implicados. Por tanto, una quemadura en la piel altera en mayor o menor medida las funciones que desempeña normalmente, como la de intervenir en el equilibrio hidroelectrolítico, la regulación térmica, aislamiento del medio externo, funciones inmunológicas y servirnos como órgano sensitivo y de relación. (Moraleda. D. et al. 2011) Pueden distinguirse distintos tipos de quemaduras de acuerdo a su origen y mecanismo de producción como:

- Quemaduras Térmicas: debido al contacto de fuego directo, escaldaduras, por líquidos o por frío extremo durante un largo período.
- Quemaduras Químicas: ocasionadas principalmente por el contacto con ácidos o álcalis.
- Quemaduras Eléctricas: por descargas eléctricas de alto y bajo voltaje de forma directa, por arco eléctrico o por efecto de rayos de tormentas.
- Quemaduras por Radiación: principalmente ocasionadas por radiación UV y otras radiaciones ionizantes. (Piriz Campos. R. et al. 2009)

Las quemaduras se clasifican de acuerdo a su profundidad y extensión. (Fernández Jimenez. I. et al. 2001)

Es necesaria una identificación adecuada para poder realizar un tratamiento óptimo. La profundidad tiene una relación directa con el tiempo de curación y el desarrollo de algún tipo de secuela, sea física o psicológica. Esta clasificación divide las quemaduras en:

- Quemaduras de primer grado o superficiales: afectan a la epidermis.
- Quemaduras de segundo grado: subdivididas en grosor parcial superficial que afectan la capa externa de la epidermis y grosor parcial profundo afectando la epidermis, pudiendo llegar hasta la dermis.
- Quemaduras de tercer grado o de grosor total: en donde la destrucción de la epidermis y la dermis es total, llegando a afectar las terminaciones nerviosas, músculos y huesos.

Según la página de la Asociación Argentina de Quemaduras, la incidencia en nuestro país es que 5 de cada 1000 habitantes por año sufrirán algún tipo de quemadura. En Argentina se considera que sufren quemaduras 190.000 personas por año. El 10% corresponde a quemaduras graves (Grado III) y críticas (Grado IV). Los adultos representan el 60% del total de quemados. La Tasa de mortalidad es del 18 al 20%. Las 2/3 partes de las quemaduras ocurren en el hogar y 10 de cada 100 quemados necesitan hospitalización de los que el 1% muere.

### 7.2.3 Efectos de las quemaduras

En la *Tabla 7.1* se lista la apariencia, síntomas y tiempo de curación para cada una de las diferentes tipos de quemaduras. (Gómez-Ayala. A. 2009)

*Tabla 7.1 Lista de las características de cada tipo de quemadura*

<i>GRADO</i>	<i>ASPECTO</i>	<i>CLÍNICA</i>	<i>EVOLUCIÓN</i>
<i>Superficiales</i>	Rojas, secas. Blanquean a la presión	Dolor	Curación 3-6 días. Sin secuelas
<i>Grosor parcial superficial</i>	Ampollas rojas y exudativas. Blanquean a la presión	Dolor y sensibilidad a la temperatura	Curación 7-20 días. Con cambios de pigmentación
<i>Grosor parcial profundo</i>	Ampollas húmedas o secas. Color variable. No blanquean	Sensibilidad a la presión. No dolor	Curación > 20 días. Cicatriz hipertrófica. Riesgo de contractura
<i>Grosor total</i>	Blancas, céricas o carbonáceas. Secas y con escaras	No sensibilidad	No curan > 2% de la superficie corporal quemada. Riesgo severo de contractura.

El efecto inmediato sobre la piel por el incremento brusco de temperatura es la desnaturalización de proteínas. Al destruirse la piel, la velocidad de pérdida de agua aumenta a 100 cc/m<sup>2</sup> /hora, siendo el volumen de pérdida normal de 15 a 21 cc/m<sup>2</sup> /hora. El alto calor específico de la piel y su baja conducción hacen que la pérdida de calor sea lenta, por lo que, a pesar de que se elimine el agente que causa la quemadura, el calor aún

presente hace que el daño continúe. Hay un aumento de catecolaminas que provoca un aumento en la actividad metabólica y el consumo de oxígeno aumenta. Al producirse la muerte de tejidos hay una reacción inmunológica general, que favorece la producción de radicales libres de oxígeno, radicales hidroxilo, peróxidos de hidrógeno producidos por los leucocitos, produciendo la inflamación general, daño en la matriz celular, inicio del metabolismo de ácido araquidónico e impide la actividad fagocítica de los macrófagos. (Alfaro Dávila. M. 2003)

Durante el desarrollo de la quemadura, las bacterias comúnmente situadas en los folículos pilosos y glándulas sebáceas pueden sobrevivir. Estas son en su mayoría del tipo gram positivo (*Staphylococcus áureus*, *Enterobacter spp*). A medida que pasa el tiempo y el organismo está expuesto al medio ambiente, las bacterias tipo gram negativo (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Proteus spp*, *Citrobacter spp* ingresan en la herida, pudiendo llegar a la piel sana o al torrente sanguíneo, siendo la más común y abundante la *Pseudomonas aeruginosa*. Estas bacterias tienen un factor de virulencia mayor que las gram positivas, pues poseen endotoxinas y exotoxinas, enzimas proteolíticas y polisacáridos extracelulares, que les dan una capacidad de sobrevivencia dentro del huésped, además de poseer una resistencia a los antibióticos intrínseca y adquirida que puede producir efectos adversos en el paciente durante la aplicación de medicamentos. (Pruitt. B. 1998)

La presencia de hongos también ha sido observada, preferentemente del tipo de candidas y otros géneros (*Torulopsis*, *Aspergillus*, *Mucoraceae*, *Zigomicetos*, *Criptococcus*).

Otra característica de las quemaduras es la variación del pH de la piel. En una piel sana, el pH suele ser 5,5 dándole una característica ligeramente ácida, pues la mayoría de las bacterias sobreviven a pH neutro. En cambio en una piel quemada, la pérdida de electrolitos, enzimas y la exposición al ambiente hacen que este pH varíe. En una etapa inicial, la piel tiene un pH alcalino entre 8 y 8,5 aumentando en el tiempo desde 9,5 a 10,5 hasta el cuarto día, sin importar el tipo de tratamiento que se diera, probablemente por la producción del organismo de sustancias de barrera. Luego, durante el proceso de regeneración, el pH empieza a decrecer hasta que la piel es nuevamente regenerada y se estabiliza en 5,5. (Osti. E. 2008)

#### **7.2.4 Tratamiento de las lesiones**

Cuando el paciente es estabilizado y se ha valorado la extensión de la quemadura, se procede a enfocar el tratamiento en la disminución de infecciones y limitar la formación de cicatrices. El tratamiento se inicia con una limpieza profunda de la quemadura para poder realizar el desbridamiento del tejido necrótico y ampollas. Para evitar la proliferación de bacterias y hongos se continúa con la quimioprofilaxis, que consiste en la aplicación de fármacos por vía tópica, los cuales poseen propiedades antibióticas y antiinflamatorias. Entre los fármacos más utilizados se encuentran la sulfadiazina de plata, nitrofurazona y plata nanocrystalina. Para que la curación sea exitosa, se deben aplicar estos fármacos continuamente, de preferencia se utiliza además un vendaje para proteger la herida y absorber los exudados. (García García. J. 2013)

La aplicación tópica de fármacos ha sido utilizada frecuentemente como un agente de prevención de infecciones. Para poder utilizarlos de forma eficiente se requiere de un método que facilite la penetración del fármaco y permita que su aplicación sea más específica para evitar concentraciones elevadas que puedan ocasionar efectos tóxicos en el paciente. (Andrades. P. et al. 2005)

Para quemaduras muy extensas o profundas, el tiempo de regeneración de la piel es largo, por lo que es necesario, en la mayoría de los casos, un procedimiento quirúrgico y aplicación de injertos que favorecerán la disminución del dolor, controlarán la pérdida de líquidos y prevendrán las infecciones. En todos los casos es necesaria la aplicación de vendajes para la protección de la nueva piel como soporte mecánico.

#### **7.2.5 Agregado de Heparina**

La Heparina (Hep) es un glicosaminoglicano sulfatado que desempeña un papel fundamental en la coagulación sanguínea. (Carr. J. et al. 2010) Su estructura química puede observarse en la *Figura 7.2*.

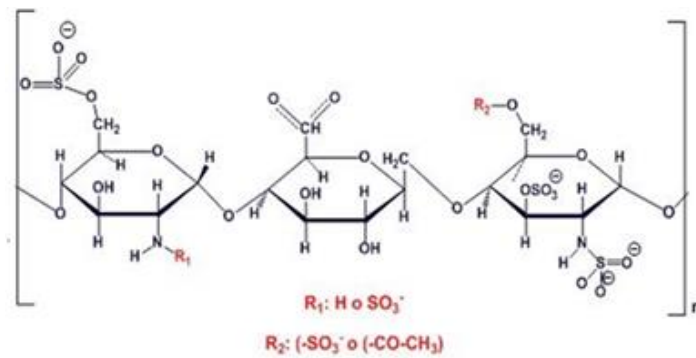


Figura 7.2 Estructura química de la Hep.

([INFO-Farmacias.com](http://INFO-Farmacias.com) Dr. Lopez Tricas. Heparinas de bajo peso molecular)

Desde hace más de 60 años se ha demostrado que la Hep es útil en el tratamiento de las quemaduras ya que posee propiedades anticoagulantes, angiogénicas, antiinflamatorias, analgésicas y regenerativas del colágeno. (Alrich. E. 1949) (Cen.Y. et al. 2000)

Los primeros estudios en animales en los que se utilizó Hep de un modo experimental demostraron que se obtenían mejores resultados en el tratamiento de las quemaduras. Por esta razón se amplió el uso a seres humanos para tratar quemaduras de segundo y tercer grado; se observó mejoría notable al reducir el uso de analgésicos, mejoría del bienestar del paciente, reducción de la frecuencia de infecciones y mejoría en el tiempo de reparación tisular. También se demostró la utilidad de la Hep al usarla por vía sistémica y por vía tópica, en irrigación directa sobre la superficie quemada y en otro tipo de heridas. (Reyes. A et al.2001) (Galvan. L. 1996)

La Hep clásica ejerce su efecto anticoagulante acelerando la formación de complejos moleculares con la participación de la Antitrombina III, mientras que los factores II (protrombina), IX, X, XI y XII quedan inactivados. Tiene particular importancia la acción ejercida sobre la trombina y el factor X. (Sigler. L. et al. 2011)

### **7.2.6 Uso de Apósitos – Matrices poliméricas**

Si bien la cicatrización de heridas es el proceso natural del cuerpo para la regeneración de daños y/o tejidos, un apósito apropiado puede ser capaz de mejorar el proceso de curación considerablemente, mediando en la etapa correcta o en la prestación de excelentes condiciones para dicho proceso. Sabiendo esto, se puede definir a un apósito como cualquier material empleado para cubrir, proteger y curar heridas de un tejido dañado, prestando las condiciones físicas necesarias y/o vehiculizando un fármaco adecuado. (Valencia-Gómez. L. et al. 2016) La utilización de apósitos en el tratamiento de heridas (tanto crónicas como agudas) es ampliamente aceptada y está estructurada a través de protocolos y guías creadas por profesionales siguiendo estándares de cuidado. (Lipsky. B. et al. 2012)

Un apósito ideal debe absorber fácilmente los componentes tóxicos de las heridas superficiales; preservar un alto nivel de humedad en la superficie de la herida; permitir el intercambio gaseoso; proporcionar aislamiento térmico; proteger la herida de la penetración de bacterias; ser no tóxico; promover la regeneración y el crecimiento del tejido nuevo y ser eliminado fácilmente. (FDA Wound healing clinical focus group. 2001)

Actualmente, existen varias tecnologías y un amplio abanico de apósitos con composición y propiedades diferentes.

### **7.2.7 Apósitos de quitosano**

La abundancia de quitina y quitosano en la naturaleza y sus amplios usos han llevado a los investigadores en todo el mundo a investigar el potencial farmacéutico y distintas aplicaciones biológicas de este biopolímero único.

El quitosano es uno de los biopolímeros más ampliamente estudiados en el desarrollo de apósitos. Es de gran utilidad en la cicatrización de heridas debido a su acción hemostática y actividad antimicrobiana. (Singla. A. et al. 2001) La presencia de varios grupos amino le permite reaccionar con una serie de fármacos aniónicos o sistemas poliméricos lo que resulta en el control del perfil de liberación de la droga y ser utilizado para liberación controlada de fármacos.

Sus soluciones viscosas permiten a la dermis la unión dermo-epidérmica y la reconstrucción de la repitelización del espesor de la piel. (Boucard. N. et al. 2007) Sin embargo, su baja porosidad se opone a cualquier transferencia física (migración) de las células vivas a lo largo de su estructura. (Domard. A. et al. 2001)

Chupa. J. et al proponen que los *films* de quitosano pueden estimular la regeneración endotelial al estimular la proliferación celular.

Los *films* de quitosano con Hep han sido ampliamente estudiados y utilizados para la cicatrización de heridas y quemaduras porque son capaces de inhibir la inflamación inducida, restablecer el flujo de sangre en un tiempo más corto, revascularizar el tejido isquémico, contribuir en la remodelación del colágeno en el sitio de la herida; lo que resultaría en una epitelización más temprana de la superficie quemada y por lo tanto en la curación. (Kweon. D. et al. 2003) (Ojagh. S. et al. 2010)

En vista de lo mencionado anteriormente, el quitosano presenta usos variados y únicos en el área farmacéutica y biológica. Se podría decir que tiene el potencial de ser utilizado como adyuvante farmacéutico para sistemas de administración de drogas así también como un compuesto biológicamente activo.

### **7.2.8 Sistemas de liberación controlada de drogas**

Los dispositivos tradicionales de administración de fármacos como son las cápsulas, tabletas, parches, inyectables, gotas supositorios y spary, normalmente tienen un control muy deficiente sobre las concentraciones de estas sustancias en el lugar de acción, lo que genera que los tratamientos sean poco eficaces. (Hamidi. M. et.al. 2008) Esto se da principalmente porque la concentración de los compuestos activos no se mantiene sostenida en el tiempo y de manera prolongada. La utilización de apósitos de base polimérica, como soporte de fármacos para controlar su liberación, es un enfoque de investigación en creciente aumento. Esto se debe a la biocompatibilidad y atractiva capacidad de hinchamiento en medio acuoso de las películas, lo cual facilitaría la liberación de medicamentos de manera controlada. La capacidad de absorción de agua, determinada por el estado de equilibrio entre las redes del *film* y el medio externo se debe al balance que ocurre entre las fuerzas osmóticas, el contenido de agua que entra en la red

y las fuerzas que ejercen las cadenas poliméricas en oposición a esa expansión. (Ortega Pozo. N. et al. 2019)

En una matriz polimérica cargada, la velocidad de liberación del fármaco es importante para determinar la concentración que el paciente recibirá en un determinado período de tiempo; de ser esta mayor a la necesaria podría ocasionar una intoxicación; si fuese menor, el fármaco sería ineficaz. (Poulsen. J. 1968) Para formas tópicas como geles o cremas se puede utilizar un modelo simple de difusión, colocándolas directamente sobre el fluido donde se difunde. Para matrices poliméricas se emplean métodos de liberación de canastilla, determinados por la United States Pharmacopeia (USP). (Siewert. M. et al. 2003)

Por lo antes expuesto, la propuesta planteada en este trabajo de tesis, fue sintetizar un apósito a partir de quitosano extraído de cáscaras de langostino de las costas del Golfo San Jorge (Qhl), entrecruzado con un producto natural como el ácido tánico y con la incorporación de Hep como cicatrizante, que sea capaz de ayudar a la recuperación y cicatrización de heridas y/o quemaduras.

### **7.3 Parte Experimental**

Se seleccionó el *film* Qhc-AT-Ce<sup>+3</sup> para agregarle Hep, debido a sus propiedades mecánicas y de flujo y se comparó con el *film* Qhl-AT-Ce<sup>+3</sup>. Se realizó la inmovilización de Hep sobre los *films*, se caracterizaron y se probó la liberación de Hep de los soportes.

#### **7.3.1 Preparación de *films* con Heparina**

El procedimiento para la preparación de los *films* es el descrito en el capítulo 6. Se realizó la inmovilización física, por interacción electrostática, de Hep a los *films* preparados. Para ello, cada *film* fue incubado durante toda la noche, a 4°C, en solución buffer salina de pH 7,4, con agregado de Hep en una concentración final de 0,5 % m/v. Luego de este tiempo, el *film* se retiró de la solución, se lavó con solución salina y se dejó

secar a temperatura ambiente. Los *films* se caracterizaron por FTIR por la metodología ya descripta.

### 7.3.2 Determinación de Heparina fijada

Se determinó la cantidad de Hep fijada a cada *film* por el método colorimétrico modificado de azul de toluidina. (Petro. M. et al. 1996) Para esto, se prepararon soluciones de NaCl 0,2%, solución de azul de toluidina: disolviendo 12,5 mg de o-toluidina en 250 mL de una solución de HCl 0,01 M que contiene 0,2 % NaCl y una solución estándar de Hep: 50 µL (16,6 mg) de Hep sódica diluida a 100 mL con 0,2% de NaCl. Se trabajó a temperatura ambiente. Se dispusieron 13 tubos de ensayo en los que se agregó 2,5 mL de colorante a cada uno. Luego se agregaron 60, 120, 180, 300, 350, 400 uL de la solución estándar de Hep a los tubos 1 a 6, respectivamente. En los tubos 7-9 se agregaron trozos de 30 mg de los *films* conteniendo Hep y en los tubos 10-12 (controles) se agregaron 30 mg de los *films* sin Hep. En el tubo 13 se agregó solución del colorante, usando este tubo también de control. Se realizó una dilución a todos los tubos agregando NaCl 0,2% hasta un volumen total de 5 mL. Luego, se agregaron 5 mL de hexano a todos los tubos y fueron agitados vigorosamente por 1 min. A continuación se centrifugaron por 10 min a 6000 r.p.m. para separar el polímero de cada solución. Finalmente, las fases acuosas de todos los tubos fueron diluidas en una proporción 1:10 con etanol y la absorbancia de cada una de las soluciones se determinó a una longitud de onda de 631 nm.

Se realizó una curva de calibración con los tubos 1-6. Se realizó el gráfico de Abs vs. Concentración de Hep, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0,998. Finalmente, se determinó el contenido de Hep unida en los soportes. (Smith. P. et al. 1980)

### 7.3.3 Ensayos de liberación controlada de Hep

Se determinó la cantidad de Hep liberada a dos temperaturas y tiempos diferentes por ensayo colorimétrico con azul de toluidina previamente descrito. Para ello, se cortó un trozo de cada *film* con Hep, se registró su peso y se colocó en un tubo de ensayo con 1 mL de solución buffer pH 7. Se agitó a 20 rpm durante 1 y 2 h a dos temperaturas diferentes, 37°C (temperatura normal corporal) y 25°C (temperatura ambiente). A continuación, se centrifugó y se determinó la absorbancia de la solución a 631 nm y se determinó la concentración de Hep liberada en el sobrenadante.

## 7.4 Resultados y Discusión

### 7.4.1 Inmovilización de Heparina

La Hep puede fijarse a los soportes poliméricos a través de interacciones físicas o bien de reacciones químicas. La inmovilización covalente puede realizarse empleando cianoborohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) como agente reductor que actúa sobre el grupo aldehído de la Hep.

Por otra parte, la interacción física es una interacción electrostática, entre las cargas negativas de la Hep y las cargas positivas del quitosano. El ligando Hep puede inmovilizarse sobre el soporte polimérico de modo estático, dejando los discos de soporte en contacto con la mezcla de reacción que contiene el ligando. Esta última fue la metodología empleada en este trabajo. Otro modo sería el dinámico donde el disco de polímero se coloca en un reservorio diseñado especialmente y la mezcla de los reactivos se hace circular a través de dicho dispositivo, con ayuda de una bomba peristáltica. (Arrua. R. & Di Mícoli. M)

La inmovilización de Hep se llevó a cabo al tiempo y la temperatura especificada, los *films* luego de este período, y una vez secos, se retiraron del cristizador manteniendo las condiciones de homogeneidad, color y textura previas. La concentración de Hep fijada sobre los *films*, determinada de acuerdo al método de azul de toluidina descrito, fue de

11,83 ug de Hep.g<sup>-1</sup> para Qhc-AT-Ce<sup>+3</sup>-Hep y 10,56 ug de Hep.g<sup>-1</sup> para Qhl-AT-Ce<sup>+3</sup>-Hep según extrapolación con la curva de calibración.

Los *films* se caracterizaron por FTIR. (Figura 7.3)

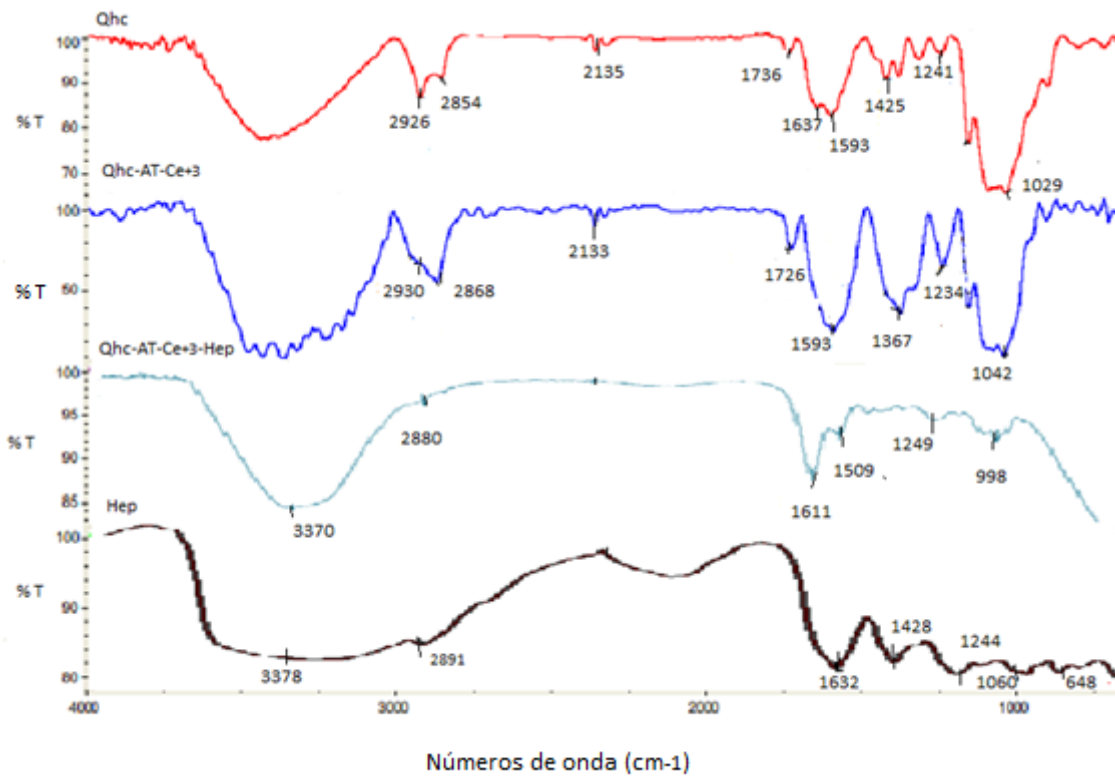


Figura 7.3 Espectros FTIR de *film* de quitosano, *film* Qhc-AT-Ce<sup>+3</sup>, *film* Qhc-AT-Ce<sup>+3</sup>-Hep y molécula de Heparina

En el espectro FTIR se observaron las bandas características del quitosano ya descritas en la *Figura 4.10* del Capítulo 4. A continuación se observa el espectro del *film* de Qhc-AT-Ce<sup>+3</sup> con sus bandas características, descrito en la *Figura 6.14* del Capítulo 6. El espectro de la molécula de Hep muestra las bandas principales de esta molécula que son: a 3378 cm<sup>-1</sup> correspondiente al estiramiento de los enlaces NH y OH; a 2891 cm<sup>-1</sup> la banda de absorción que corresponde al estiramiento de C-H; a 1632 cm<sup>-1</sup> aparece la vibración de deformación correspondiente al grupo NH<sub>2</sub> y superpuestas las de estiramiento C=O, C-N y N-H; 1428 cm<sup>-1</sup> son bandas de deformación axial asimétrica y simétrica, respectivamente, del anión carboxilato; a 1244 cm<sup>-1</sup> la deformación axial asimétrica del

grupo C-O-C y superpuesta a esta la banda de deformación axial asimétrica S=O. (Johnson. E. et al. 1976)

La banda a  $1060\text{ cm}^{-1}$  podría deberse a la banda de estiramiento del grupo  $\text{HSO}_3^-$  y en  $648\text{ cm}^{-1}$  la correspondiente al grupo S=O según otros autores. (Panzarini. L. 2003)

Para el *film* Qhc-AT-Ce<sup>+3</sup>-Hep se observa la banda de absorción a  $3370\text{ cm}^{-1}$  muy intensa por vibraciones de estiramiento del enlace -OH; la banda a  $2880\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de estiramiento C-H; la banda en  $1611\text{ cm}^{-1}$  se refiere al estiramiento C=O de la amida, deformación axial secundaria y asimétrica del anión carboxilato; a  $1509\text{ cm}^{-1}$  aparece una banda de deformación axial simétrica que podría corresponder al grupo carboxilato y a  $998\text{ cm}^{-1}$  una banda que se origina en el estiramiento vibracional C-O del alcohol primario y la deformación del grupo C-O-C. (Silverstein. R. et al. 1962) Se observa la aparición de una nueva banda a  $1249\text{ cm}^{-1}$ , que se atribuye al estiramiento asimétrico del grupo sulfonato cuando se forma un complejo entre la Hep y un polication o un simple catión. (Grant. D. et al. 1987) Por otro lado se observó una disminución de la banda a  $648\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo S=O de la Hep, en los *films*, posiblemente debido al lavado con solución salina, que pudo haber arrastrado la droga.

Por las modificaciones observadas en los espectros FTIR, sugerimos que ocurre una interacción iónica entre los grupos amino protonados del quitosano reticulado y los grupos sulfonato de la heparina con formación de un complejo polimérico aniónico-catiónico. (*Figura 7.3*)

En la *Figura 7.4* se muestran comparativamente los *films* con Qhc y Qhl. Se observan espectros similares con ambos polímeros. Las bandas encontradas evidenciarían la presencia de Hep en los *films* y sus interacciones electrostáticas entre los grupos cargados positivamente del polímero y los grupos negativos de la Hep.

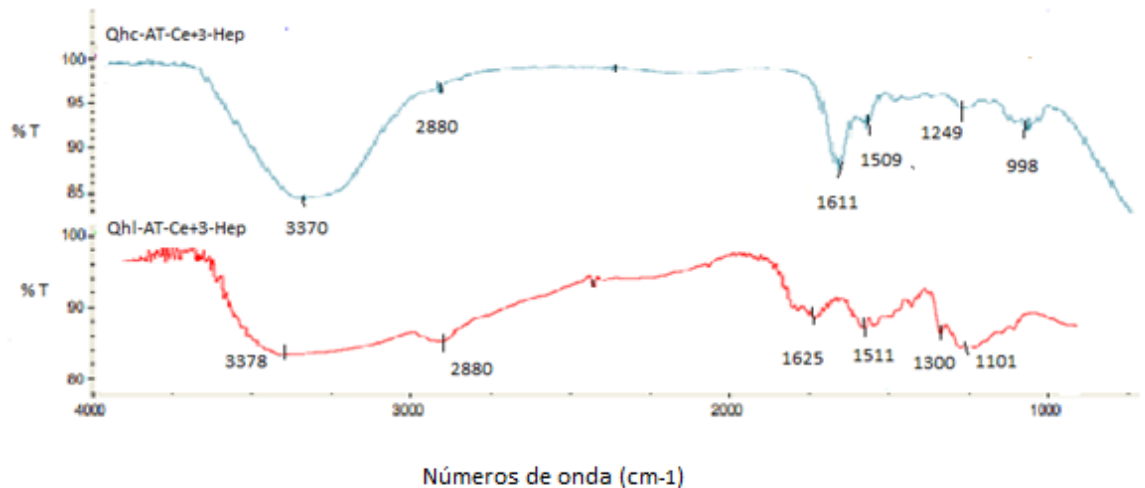


Figura 7.4 Espectros FTIR de los films Qhc-AT-Ce<sup>+3</sup>-Hep (azul) y Qhl-AT-Ce<sup>+3</sup>-Hep (rojo)

#### 7.4.2 Ensayos de liberación de Hep

El perfil de liberación de la Hep se muestra en la *Figura 7.5* a ambas temperaturas probadas en períodos de 1 y 2 horas.

La cantidad liberada de Hep del *film* Qhc-AT-Ce<sup>+3</sup>-Hep, a 37°C fue de un 56,91 % de la concentración inicial en 1 h y del 74,72 % en 2 h. A 25°C fue de un 50,52 % en 1 h y 75,14 % en 2 h.

La cantidad liberada de Hep del *film* Qhl-AT-Ce<sup>+3</sup>-Hep, a 37°C fue de un 54,65 % de la concentración inicial en 1 h y del 68,70 % en 2 h. A 25°C fue de un 48,35 % en 1 h y 71,26 % en 2 h.

Se observa que en las primeras 2 h la liberación de la droga ocurre de forma rápida, lo que podría llamarse efecto ráfaga. Debido a las interacciones iónicas establecidas entre el polímero y el fármaco durante la inmovilización electrostática, la liberación de la Hep tendría lugar a medida que se van hinchando los soportes y la Hep va saliendo por difusión, asegurando una liberación sostenida en el tiempo, como ha sido comprobado en otros trabajos. (Jin. Y. et al. 2007)

Debido a que el IH de los *films* está determinado por la variación de pH, también lo estará la liberación del fármaco. Así un aumento de pH, produciría la remoción de cargas positivas en los grupos radicales, lo que facilitaría la interacción con moléculas de agua y la liberación de la droga. El comportamiento del hinchamiento dependiente del pH es debido a las redes iónicas. (Canal. T & Peppas. N. 1989)

En nuestro estudio los valores de Hep liberados fueron similares a ambas temperaturas, para ambos *films*, lo que indica que el fármaco se libera del soporte, a la temperatura corporal normal y ambiente. La liberación de la Hep en 2 h fue prácticamente en su totalidad lo que podría considerarse óptimo para que el apósito cumpla su acción en el corto plazo de aplicación y se mantenga en el tiempo.

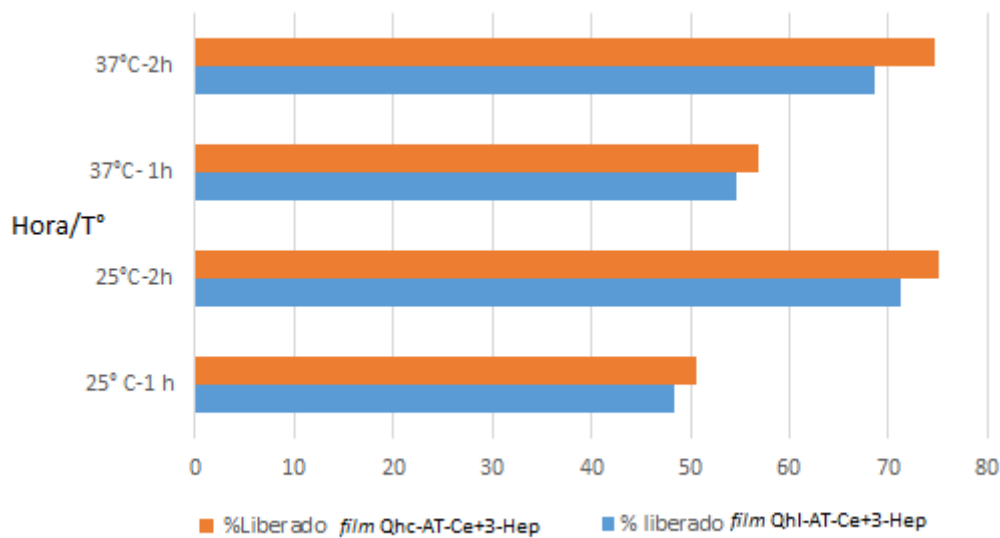


Figura 7.5 Cantidad de Hep liberada de los *films* Qhc-AT-Ce<sup>+3</sup>-Hep y Qhl-AT-Ce<sup>+3</sup>-Hep a diferentes tiempos y temperaturas

En otros estudios se ha observado que al estudiar la liberación de fármacos de hidrogeles de quitosano, hasta 120 h, se produce este efecto en las 12 primeras h luego de las cuales la liberación se vuelve lenta y sostenida en el tiempo. Ellos concluyen que la liberación en primera instancia ocurre de forma exponencial, para que luego de horas se mantenga y torne sostenida. (Ortega Pozo. N. et al. 2019)

Otros autores encontraron que la liberación de un fármaco específico, a partir de *films* de quitosano-alginato, inicialmente era mucho mayor que en los *films* de quitosano sin combinar, pero a medida que transcurre el tiempo la liberación disminuye y se vuelve constante. (García García. J. 2013) Por ejemplo, en un trabajo donde se evaluó la liberación del fármaco sulfadiazina de plata mediante el método de la canastilla a pH 9,1 para simular el pH de una herida producida por quemadura durante las primeras 24 horas. Para todos los *films* de quitosano se observó un perfil similar de liberación y aquellos *films* con concentraciones de fármaco de 0,12% tuvieron liberaciones más altas que aquellas con concentraciones de 0,06%, dando resultados consistentes. Los *films* de quitosano con sulfadiazina de plata al 0,12% resultaron ser los más adecuados ya que mantienen una liberación a altas concentraciones y con un perfil más parejo que los otros *films* durante los intervalos de tiempo medidos. (García García. J. 2013)

## 7.5 Conclusiones parciales

Analizando los espectros FTIR de los *films* se encontró que existiría una interacción iónica entre los grupos amino protonados del quitosano y los grupos sulfonato de la Hep con formación de un complejo polimérico aniónico-catiónico.

La Hep pudo fijarse en forma física a los sistemas propuestos como apósitos, por interacción electrostática, sin alterar las características propias favorables de los *films*.

La Hep pudo liberarse gradualmente de los *films*, en porcentajes diferentes que dependieron de la temperatura y el tiempo probados.

## 7.6 Bibliografía

Alfaro Dávila. M. 2003. “Quemaduras”. Hospital San Juan de Dios. San José, Costa Rica.

Alrich. E. 1949. The effect of heparin on the circulating blood plasma and proteins in experimental burns. *Surgery*. 25 (5): 676-680.

Andrades. P & Sepulda. S. 2005. Cirugía plástica esencial. Andrades P, Sepulveda S. Cicatrización patológica. Hospital clínico universitario de Chile. 3ª ed. Universidad de Chile. p: 31-44.

Arrua. R. & Di Mícoli. M. Síntesis de discos porosos derivatizados con heparina, posible uso como soportes de afinidad cromatográfica.

Beaskoetxea Gómez. P. et al. 2013. Situación actual sobre el manejo de heridas agudas y crónicas en España: Estudio ATENEA. *Gerokomos*. 24(1): 27-31.

Boucard. N. et al. 2007. Domard A. The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials*. 28(24): 3478–88.

Canal. T & Peppas. N. 1989. Correlation between mesh size and equilibrium degree of swelling of polymeric networks. *Journal of biomedical materials research*. 23(10): 1183-1193.

Carr. J & Rodak. B. 2010. Atlas de hematología clínica/clinical hematology atlas. Ed. Médica Panamericana.

Cen.Y. et al. 2000. The effect of heparin on wound healing of second-degree burned rats. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 14: 264-267.

Chupa. J. et al. 2000. Vascular cell responses to polysaccharide materials:: in vitro and in vivo evaluations. *Biomaterials*. 21(22): 2315-2322.

Domard. A & Domard. M. 2001. Chitosan: Structure-properties relationship and biomedical applications. *Polymeric Biomaterials*.1: 187–212.

FDA Wound healing clinical focus groupa. 2001. Guidance for industry: Chronic cutaneous ulcer and burn wounds—developing products for treatment: DRAFT—NOT FOR IMPLEMENTATION. *Wound Repair and Regeneration*. (9)4: 258-268.

- Fernández Jimenez. I. et al. 2001. "Quemaduras en la infancia. Valoración y tratamiento". Boletín de la Sociedad de Pediatría de Asturias, Cantabria, Castilla y León. (41): 99-105.
- Galvan. L. 1996. Effects of heparin on wound healing. *J Wound Ostomy Continence Nurs.* 23: 224-226
- García García. J. 2013. Estudio de liberación de sulfadiazina de plata desde matrices de quitosanos para su uso como apósitos en quemaduras. Tesis para optar el Título de Licenciada en Química. Pontificia universidad católica del Perú facultad de ciencias e ingeniería.
- Gómez-Ayala. A. 2009. Primeros auxilios. Quemaduras, heridas y contusiones. *Farmacia Profesion.* Elsevier. 23(5): 42-45.
- Grant. D. et al. 1987. Infrared spectroscopy of heparin-cation complexes. *Biochemical Journal.* 244(1): 143-149.
- Hachem. J. et al. 2003. "pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity/cohesion". *Journal of Investigative Dermatology.* 121(2): 345 – 353.
- Hamidi. M. et.al. 2008. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv Drug Deliv Red.* 60(15):1638-49.
- Holmes. J. et al. 2006. Principios de cirugía. In: Mc Graw Hill, 8va Edición. Mexico. p: 189-218.
- Jin. Y. et al. 2007. Effects of chitosan and heparin on early extension of burns. *Burns.* 33(8): 1027-1031.
- Johnson. E. et al. 1976. Four Heparin Preparation: Anti-Xa Potentiating Effect of Heparin after Subcutaneous Injection. *Thromb. Haemostas. (Stuttg.).* 35:586-591.
- Kweon. D & Song. S. 2003. Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. *Biomaterials.* 24(9):1595–601.
- Lazaurus. G. 1994. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wounds.* p:130:489.
- Lipsky. B. et al. 2012. Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis.* 54: 32-73.

López. J & Cuervo. F. 2010. Apósitos impregnados en agente antibacteriano: estudio multicéntrico, en heridas agudas y crónicas, con Atrauman AG. Revista ROL de enfermería. 33(11): 6-15.

Merino. J & Noriega. M. 2012. “Fisiología General”. Open courseware. España: Universidad de Cantabria.

Merriam-Webster Dictionary. Available at: <http://www.merriam-webster.com>.

Moraleda. D. et al. 2011. Tratamiento de las quemaduras. Urgencias Quirúrgicas. p: 399.

Ojagh. S. et al. 2010. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. Food Chemistry. 122(1): 161-166.

Ortega-Pozo. N. et al. 2019. Síntesis y evaluación cicatrizante de un apósito en base a un hidrogel con propiedades de liberación sostenida de compuestos bioactivos (Doctoral dissertation, Universidad de Talca (Chile). Escuela de Tecnología Médica.

Osti. E. 2008. Skin ph variations from the acute phase to re-epithelialization in burn patients treated with new materials (burnshield®, semipermeable adhesive film, dermasilk®, and hyalomatrix®). Non-invasive preliminary experimental clinical trial. Annals of burns and fire disasters. 21(2): 73.

Panzarini. L. 2003. Estudo da enxertia e heparinização simultâneas do poli (cloreto de vinila), via radiação gama.

Petro. M. et al. 1996. Immobilization of trypsin onto “molded” macroporous poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) rods and use of the conjugates as bioreactors and for affinity chromatography. Biotechnology and bioengineering. 49(4): 355-363.

Piriz Campos. R & De la Fuente Ramos. M. 2009. “Quemaduras”. Enfermería Médico Quirúrgica Tomo III. Madrid, Editorial DAE, pp. 1123- 1137.

Poulsen. J. 1968. “Effect of Tropical vehicle composition on the In Vitro Release of Fluocinolone Acetonide and its Acetate Ester”. Journal of Pharmaceutical Sciences. 57(6): 928- 933.

Pruitt. B. 1998. "Burn Wound infections: Current status". *World Journal of Surgery*. (22): 135-145.

Ramos Quispe. K. 2013. Evaluación de la reepitelización en el tiempo y la estética de la piel de heridas por quemaduras de segundo grado tras el uso de la membrana de huevo, en modelo animal. Trabajo de Tesis de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa – Perú.

Reyes. A. et al. 2001. Burns treated with and without heparin: Controlled use in a thermal disaster. *Ann Burns Fire Disasters*. 14: 183-191.

Ruiz-Carrascosa. J & Ruiz-Villaverde. R. 2015. Características ecográficas de la piel normal Sonographic features of normal skin. *Tecnología en Marcha*. 28: suppl.1 Cartago.

Siewert. M. et al. 2003. "AAPS Guidelines to Dissolution/in Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms". *AAPS PharmSciTech*. 4(1): 43-52.

Sigler. L & Krotzsch. E. 2011. Heparina en quemaduras de segundo grado profundo en un modelo murino. *Cirujano general*. 33(2): 86-90.

Silverstein. R & Bassler. G. 1962. Spectrometric identification of organic compounds. *Journal of Chemical Education*. 39(11): 546.

Singla. A & Chawla. M. 2001. Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects-an update. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 53(8): 1047-1067.

Smith. P. et al. 1980. Colorimetric Method for the Assay of Heparin Content in Immobilized Heparin Preparations. *Analytical Biochemistry*. 109: 466-473.

Teller. P & White. T. 2009. Fisiología de la cicatrización de la herida: de la lesión a la maduración. *Clínicas quirúrgicas de Norteamérica*. 3: 599-610.

Valencia-Gómez. L. et al. 2016. Apósitos de polímeros naturales para regeneración de piel. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*. 37(3): 235-249.

## ***Conclusiones Finales***

Son conocidos los problemas de contaminación ambiental en la región costera, patagónica, por la acumulación de residuos de la industria pesquera, lo que ocasiona aumento de población de especies invasoras y contaminación visual junto a malos olores. Por otro lado, el excesivo e indebido uso de productos plásticos derivados del petróleo, en la actualidad, es otro factor que provoca daño ambiental debido a las consecuencias derivadas de la acumulación y destino final de los mismos. Por todo ello, la comunidad científica se ha abocado, en los últimos años, a desarrollar alternativas que brinden soluciones a corto o mediano plazo.

Con el objetivo de contribuir en este sentido, este trabajo de tesis buscó desarrollar materiales poliméricos capaces de reemplazar parcialmente a los plásticos sintéticos tradicionales por otros de características biodegradables. En particular, la utilización de dichos materiales, preparados a partir de fuentes de origen natural, se presenta como una opción válida por el hecho de provenir de fuentes muy abundantes y de bajo costo, lo que aumenta su valor agregado. Para salvar los inconvenientes en sus propiedades mecánicas y de transporte, que los vuelven no adecuados para las aplicaciones biomédicas propuestas, el presente trabajo de Tesis Doctoral basó sus objetivos en el desarrollo de diversas metodologías sintéticas, de modificación, acondicionamiento o de preparación de los materiales naturales de partida, que posibiliten la obtención de *films* con propiedades macroscópicas óptimas, para su utilización en biomedicina. Se utilizó quitosano como materiales de partida y se realizaron modificaciones químicas (mediante la formación de redes entrecruzadas por enlaces covalentes y no covalentes).

Se alcanzaron los objetivos principales de este trabajo, el desarrollo de materiales poliméricos por una vía sustentable, empleando polímeros, agente entrecruzante y aditivos de origen natural y a partir de fuentes renovables. Se agregó un agente cicatrizante al material, que logró unirse en forma física y liberarse para darle utilidad biomédica.

La producción de este tipo de apósitos podría llevarse a escala industrial, adaptando los métodos de obtención de quitosano y gelatina de pescado y preparando los *films* entrecruzados con ácido tánico y cerio como antifúngico.

Para la síntesis de quitina resultó óptima la metodología enzimática por sobre la química debido a la menor producción de residuos químicos y con un rendimiento dentro de los valores encontrados en bibliografía. El uso de residuos costeros, como materia prima para su obtención, permite obtener polímeros alternativos a los derivados del petróleo para uso biomédico así también como resolver un problema ecológico debido a la acumulación de residuos en las costas patagónicas.

Por desacetilación de la quitina, se obtuvo un quitosano con características similares al quitosano comercial. Los rendimientos gravimétricos se mantuvieron dentro de los valores encontrados en bibliografía, indicando que sería posible obtener un quitosano de buena calidad a partir de caparzones extraídos del Golfo San Jorge.

La gelatina de pescado obtenida a partir de la piel de merluza mostró propiedades comparables a las de la gelatina comercial y las gelatinas de pescado encontradas en bibliografía. Su uso en los *films* propuestos aporta un valor agregado, debido a que su obtención es a través de una metodología sencilla, económica y basada en recursos naturales renovables de la región patagónica.

Se sintetizaron y caracterizaron *films*, siguiendo una metodología de síntesis sencilla. Se evaluó la influencia de diferentes agentes entrecruzantes del quitosano y se determinó cual sería el más conveniente para el uso propuesto.

El genipín mostró buenas propiedades como agente entrecruzante del quitosano, formando *films* con propiedades de transporte adecuadas para el uso como apósito con utilidad biomédica. Su origen natural permitiría sustituir compuestos altamente tóxicos usados como entrecruzantes, como el glutaraldehído. Debido a su elevado costo, se decidió probar nuevos entrecruzantes.

El AT como agente entrecruzante arrojó resultados prometedores. Los *films* Qhl-GP-TA-Ce<sup>+3</sup> podrían usarse como apósitos con utilidad biomédica. Estos materiales fueron estables en medio acuoso a diferentes pH, salvando la principal limitación que tiene el uso de la gelatina como material biomédico, debido a su marcada característica higroscópica. Además, los *films* mostraron buenas propiedades mecánicas, y sus valores de permeabilidad al vapor de agua e índice de hinchamiento fueron semejantes al de otros biopolímeros entrecruzados. Se evaluó la influencia de diferentes concentraciones del agente entrecruzante, obteniéndose los mejores resultados con los *films* entrecruzados en

una concentración del 10% del AT respecto al biopolímero seco. El AT aseguraría una buena biocompatibilidad debido a su origen natural.

El uso de ión  $Ce^{+3}$  evitó la contaminación de los *films* actuando como agente antifúngico en todos los sistemas en los que se utilizó, ya que permitió que los *films* no se contaminaran sin modificar perjudicialmente las propiedades mecánicas ni de transporte de los mismos.

Se probó la carga de la Heparina, por sus propiedades como agente cicatrizante. El agregado de Heparina por inmovilización electrostática fue posible, como así también su liberación dependiente del tiempo y la temperatura. Por lo que estos *films* resultaron novedosos y se propone su uso como apósitos en el tratamiento de quemaduras. La liberación de Heparina por difusión pasiva parece ser controlada por el índice de hinchamiento, donde la exposición del *film* a un determinado fluido produce la liberación de la droga contenida.

Los aceites esenciales probados, de canela y clavo de olor mostraron buenos resultados como agentes antifúngicos, ya que evitaron la contaminación de los *films* en los que se agregaron. Por otro lado, no modificaron perjudicialmente los valores de permeabilidad al vapor de agua e índice de hinchamiento de los *films*. Su origen natural podría pensarse que es favorable, respecto al uso de  $Ce^{+3}$ , como agente antifúngico. Permanecen pendientes nuevos estudios microbiológicos de los *films*. Se propone evaluar en nuevos estudios la influencia de diferentes concentraciones de los aceites y diferentes técnicas de unión al polímero, como la inmersión del *film* en una solución del aceite para evaluar las mejores condiciones de unión.

Se concluye así que en este trabajo de Tesis, se logró sintetizar un apósito de quitosano y gelatina, extraídos de fuentes naturales, y utilizando ácido tánico como agente entrecruzante y  $Ce^{+3}$  como agente antifúngico; que es capaz de hincharse sin sufrir degradación y a la vez, de liberar la droga Heparina unida físicamente.

Estos *films* obtenidos a partir de polímeros de origen natural contribuirían a la química verde ya que, por un lado, ofrecen una vía alternativa del uso de los residuos de la industria pesquera en la zona, cuidando el medio ambiente; y por otro el reemplazo de materiales plásticos sintéticos por materiales biodegradables.

Una virtud lograda en el desarrollo de esta Tesis Doctoral es el aporte que brinda al conocimiento científico en cuanto a las variadas temáticas abordadas:

Se han desarrollado materiales a partir de metodologías sencillas desde de punto de vista químico.

Se han aplicado metodologías variadas en la caracterización de los materiales preparados, posibilitando un análisis muy completo desde diversos aspectos.

La posibilidad de uso de este tipo de *films* en el área biomédica, marca un avance en el gran potencial que presentan los mismos para el tratamiento local de quemaduras.

Algunos de los resultados y conocimientos adquiridos durante este trabajo de tesis pueden servir como bases para futuras investigaciones y otros, por sus características, podrían ser aplicados a gran escala en corto plazo.

Los resultados expuestos en este trabajo de tesis representan innovaciones tecnológicas muy relevantes. Por ejemplo, la utilización de *films* entrecruzados, biodegradables, para liberación de fármacos. El impacto ambiental de este trabajo es positivo desde dos aspectos, por un lado, los productos obtenidos a partir de fuentes naturales permiten reutilizar residuos que ocasionan un problema ambiental; y por otro; todos los productos utilizados como materias primas y reactivos que se han utilizado en la fabricación de los *films* son biocompatibles y biodegradables, de manera que el impacto ambiental es mínimo.

Como proyección del presente trabajo de tesis, se planifica la preparación de *films* de quitosano con micropartículas del mismo, injertadas, para estudiar las modificaciones en la liberación de la droga y así continuar con los estudios de aplicación que permitan aumentar el valor agregado de los *films* de polímeros naturales en el área biomédica.

FIN