

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

**Formación de hidrogeles con alcohol polivinílico oxidado y
quitosano con posible aplicación en la liberación controlada de
fármacos**

María Camila Maldonado Muñoz

Ingeniería Química

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ing. Química

Quito, 28 de abril de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Formación de hidrogeles con alcohol polivinílico oxidado y quitosano con
posible aplicación en la liberación controlada de fármacos**

María Camila Maldonado Muñoz

Nombre del profesor, Título académico

José Francisco Álvarez Barreto, PhD.

Nombre del profesor, Título académico

José Ramón Mora, PhD.

Quito, 28 de abril de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: María Camila Maldonado Muñoz

Código: 00130415

Cédula de identidad: 1720579745

Lugar y fecha: Quito, abril de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Se estudió la formación y estabilidad de hidrogeles con alcohol polivinílico oxidado (PVAox) y quitosano. La post-modificación del alcohol polivinílico (PVA), mediante su oxidación, fue llevada a cabo para mejorar algunas de sus propiedades, como la solubilidad y la viscosidad además de incrementar la disponibilidad del grupo funcional carbonilo en el mismo. Se observó resultados favorables al realizar la oxidación con H_2O_2 al 15% con CuSO_4 como catalizador al 0.05%, determinando un incremento de 0.53 grupos funcionales carbonilo por cada 100 gramos de glucosa. Respecto a la formación de hidrogeles, se varió la concentración de quitosano entre 1% y 1.5%, se realizó la oxidación de PVA con 2 grados de hidrólisis diferentes, además de variar la proporción entre ambas soluciones para la formación del hidrogel. Se realizó la caracterización de estos hidrogeles al analizar su grado de hinchamiento en una solución buffer fosfato salino (PBS), observando importantes diferencias en las distintas formulaciones, donde aquellos que tenían un PVA con grado de hidrólisis bajo fueron más estables en el tiempo. En relación a la morfología obtenida mediante los análisis de microscopía electrónica de barrido, se observó que los biomateriales presentaron una estructura porosa. Se confirmó la formación de la base de Schiff entre el alcohol oxidado y el quitosano mediante el análisis de los espectros infrarrojo de los hidrogeles. La concentración de quitosano no presentó un efecto significativo sobre el grado de hinchamiento, a diferencia del grado de hidrólisis del PVA, que mostró diferencias notorias. Se determinó que la proporción PVAox:Quitosano en relación 1:2 tuvo mayor estabilidad en el tiempo, además de alcanzar un grado de hinchamiento mayor.

Palabras clave: Alcohol Polivinílico (PVA), Quitosano, Oxidación, Hidrogeles, Entrecruzamiento químico, Base de Schiff.

ABSTRACT

The formation and stability of hydrogels with oxidized polyvinyl alcohol (PVAox) and chitosan were studied. The post-modification of polyvinyl alcohol (PVA), through its oxidation, was carried out in order to improve some of its properties, such as solubility and viscosity, in addition to increasing the availability of the carbonyl functional group. Favorable results were observed when carrying out the oxidation with 15% H₂O₂ and 0.05% CuSO₄ as its catalyst, determining an increase of 0.53 carbonyl functional groups per 100 grams of glucose. Regarding the formation of hydrogels, its study was carried out by varying the concentration of chitosan between 1% and 1.5%, the oxidation of PVA was carried out with 2 different degrees of hydrolysis, besides varying the proportion between both solutions for the formation of the hydrogel. These hydrogels were characterized by analyzing their degree of swelling in a phosphate-buffered saline (PBS) solution, observing important differences in the different formulations, where those with a lower hydrolysis degree, for PVA, were more stable over time. In relation to the morphology obtained by scanning electron microscopy, these biomaterials presented a porous structure. The formation of the Schiff base between the oxidized alcohol and the chitosan was confirmed by analyzing the infrared spectra of the hydrogels. The concentration of chitosan did not showed a significant effect on the swelling degree, unlike the degree of hydrolysis of PVA, which showed marked differences. The ratio of PVAox:Chitosan of 1:2 had greater stability over time, in addition it reached a higher degree of swelling.

Key words: Polyvinyl Alcohol (PVA), Chitosan, Oxidation, Hydrogels, Chemical Crosslinking, Schiff's Base.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción.....	10
2. Metodología.....	14
2.1. Oxidación de PVA (PVAox)	14
2.2. Formación de hidrogeles con PVAox y quitosano	14
2.3. Caracterización de materiales	16
2.4. Análisis estadístico: análisis de varianza (ANOVA) y Tukey.....	18
3. Resultados y Discusión.....	18
3.1. Definición del mejor método de oxidación.....	18
3.2. Análisis morfológico de los hidrogeles.....	20
3.3. Estudio de estabilidad de hidrogeles.....	23
4. Conclusiones y Recomendaciones.....	29
5. Referencias	31
6. Anexos	37
6.1. Anexo A: ANOVA para métodos de oxidación	37
6.2. Anexo B: Comparación por método de Tukey para protocolos de oxidación	38
6.3. Anexo C: ANOVA para prueba de hinchamiento	39
6.4. Anexo D: Comparación por método de Tukey para prueba de hinchamiento	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Variables y niveles para formación de hidrogeles	15
Tabla 2: Codificación de hidrogeles según su formulación.....	16

ÍNDICE DE FIGURAS

<p>Figura 1: Comparación de métodos de oxidación según la cantidad de grupos carbonilo. El grupo de control corresponde al PVA previo a la oxidación, el protocolo 1 representa la oxidación con H₂O₂ y el protocolo 2 la oxidación con H₂O₂ y CuSO₄.</p>	20
<p>Figura 2: Morfología de los hidrogeles en escala macroscópica. (A) Mayor proporción de quitosano 1:2. (B) Mayor proporción de PVAox. 2:1</p>	21
<p>Figura 3: Micrografías electrónicas de hidrogeles a 500x. (A) Grado de hidrólisis de PVA bajo. (B) Grado de hidrólisis de PVA alto. (1) Quitosano al 1%. (2) Quitosano al 1.5%. Barra de calibración: 50µm.....</p>	22
<p>Figura 4: FTIR de hidrogeles con quitosano al 1% (1) y 1.5% (2) en combinación con PVAox a diferentes niveles. (A) Grado de hidrólisis bajo. (B) Grado de hidrólisis alto.....</p>	24
<p>Figura 5: Curva de hinchamiento de hidrogeles con grado de hidrólisis bajo en diferentes proporciones. (A) Quitosano al 1%. (B) Quitosano al 1.5%</p>	26
<p>Figura 6: Curva de hinchamiento de hidrogeles con grado de hidrólisis alto en diferentes proporciones. (A) Quitosano al 1%. (B) Quitosano al 1.5%. Nota: las curvas incompletas corresponden a hidrogeles que se desintegraron significativamente después del último tiempo reportado, y no pudieron ser pesados a partir de ese punto.....</p>	26

1. INTRODUCCIÓN

Un hidrogel es un material polimérico que tiene la capacidad de retener agua, al igual que fluidos biológicos, en su estructura tridimensional (Mahinroosta, Jomeh Farsangi, Allahverdi, & Shakoori, 2018). Estas estructuras han sido estudiadas ampliamente en los últimos años debido a su gran variedad de aplicaciones, entre las que se pueden encontrar: ingeniería de tejidos, liberación controlada de fármacos y proteínas, dispositivos oftalmológicos, implantes, entre otras (Barbucci, 2009). En las últimas décadas ha existido una tendencia hacia los hidrogeles de origen sintético como reemplazo a los de origen natural (Ahmed, 2013). Los polímeros que permiten la formación de los hidrogeles pueden presentar grupos funcionales de tipo hidrofóbico y/o hidrofílico. Los grupos hidrofílicos permiten que este material absorba agua, generando el crecimiento del gel conocido como hinchamiento (Hamedi, Moradi, Hudson, & Tonelli, 2018).

Una de las formas de clasificar un hidrogel es según su enlace o entrecruzamiento. Un entrecruzamiento físico no es permanente y se genera por interacciones físicas de las cadenas de polímeros (Maitra & Shukla, 2014). Por otra parte el entrecruzamiento químico es permanente y, comúnmente, llevado a cabo por medio la adición de un agente entrecruzante; sin embargo, también es posible mediante la reacción de determinados grupos funcionales (Mahinroosta et al., 2018). La materia prima para la formación de un hidrogel corresponde a un polímero, tanto de origen natural como sintético. Entre algunos de los materiales más usados se puede encontrar: poli acetato de vinilo, poli ácido acrílico, dimetilacrilato de etilenglicol, alginato, celulosa, gelatina, quitosano, entre otros (Laftah, Hashim, & Ibrahim, 2011; Mahinroosta et al., 2018).

En cuanto al quitosano, este es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa, (Iannace, Sorrentino, & Di Maio, 2014). Los biomateriales en base a quitosano han generado relevancia ya que corresponde a un material biocompatible y biodegradable (T. Jiang, James, Kumbar, & Laurencin, 2014). Otras de sus propiedades destacadas comprenden la antimicrobiana, anticoagulante, antibacterial, entre otras (Hamedi et al., 2018). El quitosano proviene de la desacetilación de la quitina, que se encuentra en el exoesqueleto de ciertos crustáceos, tales como los camarones e insectos, por lo que se presenta como un material natural y renovable (Mohebbi et al., 2019). Previamente ya se han realizado estudios con el uso de quitosano, por su cuenta y en conjunto con otros materiales, para la formación de hidrogeles y su aplicación en el área de liberación controlada de fármacos (Safdar, Omar, Arunagiri, Regupathi, & Thanabalan, 2019), presentando resultados favorables, que permiten la liberación controlada de diferentes fármacos, sin exceder los límites de dosis recomendados. A pesar de sus excelentes propiedades los estudios con este material se ven condicionados debido a su solubilidad exclusiva en medios ácidos y reactividad limitada, además de algunas de sus propiedades físicas, como su rigidez (Thapa & Narain, 2016).

Adicionalmente el Ecuador es un país conocido por su industria camaronera (Gómez-Ríos, Barrera-Zapata, & Ríos-Esteba, 2017), que genera una gran cantidad de residuos, aproximadamente equivalente al 45-48% del peso de este crustáceo, dependiendo de la especie (Kandra, Challa, & Kalangi Padma Jyothi, 2012), por lo que la producción de quitosano a partir de esta materia prima puede ser considerada como un área de interés.

Asimismo el alcohol polivinílico (PVA) es un polímero, proveniente de la hidrólisis del acetato de polivinilo (Ma et al., 2017) conocido por sus propiedades biodegradables y

solubilidad en medio acuoso (Nkhwa, Lauriaga, Kemal, & Deb, 2014). Existen algunos estudios sobre este material para la formación de hidrogeles (S. Jiang, Liu, & Feng, 2011); sin embargo, el enfoque de gran parte de ellos es mediante un entrecruzamiento de tipo físico, a través de congelamiento/descongelamiento (Hassan & Peppas, 2000). A pesar de ser un método bastante eficiente, al ser reversible no comprende un sistema estable en comparación al entrecruzamiento químico. Una de las mayores limitantes de este material corresponde a su origen sintético por lo que no comprende una fuente de obtención renovable, representando un obstáculo en su uso como biomaterial (Gaaz et al., 2015), en contraste con que esta materia prima es relativamente económica, en conjunto con las cualidades previamente mencionadas es un compuesto de interés, para el área de estudio.

Existen ciertos mecanismos que permiten la modificación química del PVA, uno de ellos corresponde a la post-modificación que incluye la oxidación del compuesto. Esto se realiza con el fin de mejorar ciertas propiedades (disminuir viscosidad y cristalización), además de presentar la disponibilidad de nuevos grupos funcionales que brinden mayores posibilidades de entrecruzamiento químico y disminuir la formación de puentes de hidrógeno con otras moléculas (Lu, Kong, Jing, Hu, & Zhu, 2013).

Una de las mayores aplicaciones de los hidrogeles en el ámbito de bioingeniería corresponde a la liberación controlada de fármacos (Altinisik & Yurdakoc, 2014). Mediante el estudio de las propiedades de hinchamiento de este material, es posible desarrollar una matriz para liberar un fármaco de manera controlada (Ganji & Vasheghani-Farahani, 2013). El objetivo de liberar los fármacos de esta manera, corresponde a evitar las administraciones de fármacos tradicionales, también llamadas emboladas en la que el material no se encuentra encapsulado, pues estas incluyen dosis repetitivas además de altas concentraciones del

fármaco que en algunos casos exceden el rango terapéutico sugerido (Caccavo, Cascone, Lamberti, Barba, & Larsson, 2016). Por ejemplo uno de los problemas que presentan los fármacos administrados por la vía oral, se ven reflejados en su corto tiempo en el organismo además de su falta de focalización al sitio deseado (Li & Mooney, 2016).

Existen estudios previos, en lo que respecta a la formación de hidrogeles de quitosano y PVA, en conjunto y por separado, con el objeto de realizar liberación controlada de fármacos (Abdel-Mohsen, Aly, Hrdina, Montaser, & Hebeish, 2011; Rodríguez-Rodríguez, García-Carvajal, Jiménez-Palomar, Jiménez-Avalos, & Espinosa-Andrews, 2019), sin embargo, no se ha tomado en consideración el efecto de oxidar el PVA en el entrecruzamiento.

Por lo mencionado anteriormente, en el presente trabajo se busca realizar un entrecruzamiento químico, evitando la adición de agentes entrecruzantes potencialmente tóxicos. Una de las formas de lograr este objetivo, es mediante la formación de una Base de Schiff, también conocido como grupo funcional imina (Xu, Liu, & Hsu, 2019), que se forma mediante la reacción de un grupo amino primario, que se encuentra presente en el quitosano (T. Jiang et al., 2014), con un aldehído o cetona (grupo funcional carbonilo) el cual se encuentra presente en el PVA oxidado (Clarke & Blout, 1946). Es por esto que uno de los principales propósitos de este estudio, corresponde a aprovechar las ventajas que presentan ambos materiales, y de esta manera poder realizar un biomaterial compuesto por PVA oxidado y quitosano con una posible aplicación en la encapsulación y liberación controlada de fármacos.

2. METODOLOGÍA

2.1. Oxidación de PVA (PVAOX)

2.1.1. Protocolos de oxidación: se evaluaron dos protocolos de oxidación del PVA, tomando en consideración el efecto del sulfato de cobre como catalizador en el proceso de oxidación.

- A.** Sin catalizador: Se realizó la oxidación de PVA de grado de hidrólisis 86.7-88.7% (Mowiol 18-99, Sigma Aldrich). La metodología se basa en la oxidación mediante peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% w/w, como agente oxidante, en base al protocolo propuesto por Takayama (1960). Se preparó una solución de PVA al 10% w/v diluyéndolo en H_2O_2 al 15% v/v, cubriendo la muestra con aluminio. La oxidación se llevó a cabo a 100°C, con agitación por 200 minutos. Se reguló el pH hasta 7 con NaOH 2M. Se precipitó la muestra con acetonitrilo en una proporción 1:1 v/v. Se dejó secar el precipitado a 40°C, hasta mantener peso constante.
- B.** Con catalizador: Se oxidó el PVA con la misma metodología anterior añadiendo una solución de sulfato de cobre ($CuSO_4$) al 10% w/v, como catalizador. Se añadió la solución de catalizador una vez que el PVA se disolvió, hasta llegar a un porcentaje de cobre de 0.05% v/v (Lu et al., 2013).

2.2. Formación de hidrogeles con PVAox y quitosano

2.2.1. Preparación de las soluciones de quitosano y PVAox

- A.** Para la preparación de la solución de quitosano, se utilizaron dos niveles: 1% y 1.5% w/v. Se disolvió el quitosano en una solución de HCl 0.1M a 60°C con

agitación. Se reguló el pH entre un rango de 5.4-5.5. Se mantuvo la solución a 4°C hasta su uso

- B.** Para la preparación de la solución de PVAox, con lo obtenido después de secar el PVAox, se trituró y se preparó una solución 20% w/v. Se diluyó el compuesto en agua destilada a baño María, a 100°C, realizando agitación mediante vórtex cada 10 minutos.

2.2.2. Entrecruzamiento de hidrogeles: diseño experimental

Tabla 1: Variables y niveles para formación de hidrogeles

Variable de Entrada	Niveles
Grado de Hidrolisis de PVA (mol%hidrolisis)	Alto*
	Bajo**
Concentración de Quitosano (%w/v)	1%
	1.5%
Proporción PVAox:Quitosano (v:v)	1:1
	2:1
	1:2

*99.0-99.8% **86.7-88.7%

Mediante las variables expresadas en la Tabla 1, se realizaron todas las combinaciones posibles, determinando un diseño experimental con 3 variables, dos de ellas con 2 niveles y una con 3 niveles. Para la formación de hidrogeles, se colocó el volumen de cada solución requerido según el tratamiento. Se homogenizó la solución con una espátula por 3 minutos, se centrifugó la muestra a 1000 g's por 1 minuto y se dejó entrecruzar por 20 horas en una caja de 24 pocillos. En la Tabla 2 se puede observar todas las combinaciones realizadas y sus códigos de referencia.

Tabla 2: Codificación de hidrogeles según su formulación

		Quitosano	
PVAox	Proporción (PVAox:Quitosano)	1%	1.5%
Bajo	1:1	PLQ1-A	PLQ1.5-A
	2:1	PLQ1-B	PLQ1.5-B
	1:2	PLQ1-C	PLQ1.5-C
Alto	1:1	PHQ1-A	PHQ1.5-A
	2:1	PHQ1-B	PHQ1.5-B
	1:2	PHQ1-C	PHQ1.5-C

2.3. Caracterización de materiales

A. Cuantificación de grupos carbonilo:

Se realizó un análisis cuantitativo de los grupos carbonilos presentes en el PVAox con una adaptación del método propuesto por Smith (1967). Se preparó una solución con 1 g de PVAox en 25 mL de agua destilada. Se reguló el pH hasta 3.2 con HCl 0.1M y se añadió 7.5 mL de hidroxilamina. Se dejó en el horno a 40°C por 4 horas y se tituló la muestra con HCl 0.1M hasta obtener un pH de 3.2 (Lu et al., 2013). El proceso se realizó por triplicado y también se preparó un blanco. La cantidad de carbonilos se define por:

$$\frac{CO}{100GU} = \frac{(V_b - V_s) \times M \times 0.028 \times 100}{W} \quad (1)$$

Donde V_b es el volumen de titulación del blanco, V_s es el volumen de titulación de la muestra, M corresponde a la concentración de HCl en molaridad y W el peso exacto de la muestra. Las unidades de esta ecuación se encuentran en cantidad de grupos carbonilo por 100 unidades de glucosa.

B. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR):

Las muestras de hidrogeles fueron analizadas en un espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier de Agilent Technologies modelo Cary 630 con un módulo de reflexión total atenuada (ATR), esta prueba se realizó con el fin de determinar la presencia o ausencia del grupo funcional imina (también conocida como base de Schiff).

C. Microscopía electrónica de barrido (SEM):

Con el fin de analizar la morfología de los hidrogeles se realizó microscopía electrónica de barrido de todas las muestras en un equipo JEOL JSM-IT300, asistido por el programa MP-96040EXCS. Los hidrogeles fueron liofilizados previamente, con el fin de preservar su estructura porosa y estudiados a 5kV y 50 Pa, con electrones secundarios (Ahmed, 2013).

D. Grado de Hinchamiento:

Se observó el comportamiento de los hidrogeles en una solución de buffer fosfato salino (PBS) 1x, con pH 7.4 con el fin de determinar el porcentaje de hinchamiento en función del tiempo. Se pesó la muestra inicialmente, y se añadió 2 mL de PBS en la caja de 12 pocillos. Se obtuvo el peso de las muestras, en rangos de tiempo de 15, 30, 60, 120, 240, 300, 360, 1440, 2880 y 4320 minutos. El proceso se llevó a cabo a 30°C, con el fin de simular la temperatura de la superficie de la piel, en una incubadora. El porcentaje de hinchamiento se definió mediante la ecuación 2.

$$\% \text{ Hinchamiento} = \frac{W_t - W_o}{W_o} \times 100\% \quad (2)$$

Donde W_t corresponde al peso en el tiempo y W_o peso inicial de la muestra (Ahmed, 2013).

2.4. Análisis estadístico: análisis de varianza (ANOVA) Y Tukey

Todas las muestras fueron replicadas al menos 2 veces y corridas de manera aleatoria, por lo que se realizó ANOVA y un análisis de comparación múltiple mediante el método de Tukey con un nivel de confianza de 95%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Definición del mejor método de oxidación

La cuantificación de grupos carbonilo se expone en la Figura 1 se puede observar que ambos protocolos de oxidación, presentan un incremento significativo respecto al grupo de control (PVA previo a la oxidación), fenómeno que se corrobora, pues la comparación de medias mediante la prueba de Tukey (Anexo 2) es diferente para los 3 protocolos, por lo tanto estadísticamente estos también son diferentes. Además se demuestra que el protocolo de oxidación es un factor significativo, ya que su valor p es menor a 0.05 (Anexo 1). Por otra parte en la Figura 1 se muestra que el protocolo en el que se utiliza CuSO_4 presenta el mayor incremento de grupos carbonilo, de todos los protocolos. En el caso del protocolo 1 solamente se utiliza peróxido de hidrógeno como agente oxidante (Denisov, Sarkisov, & Likhtenshtin, 2003) que corresponde a un componente que actúa como agente reductor y oxidante a la vez.

Por otra parte, el mejor rendimiento observado por parte del protocolo dos puede estar relacionado de manera estrecha con la presencia de una reacción de tipo redox donde el peróxido de hidrógeno actúa como agente oxidante y el sulfato de cobre (CuSO_4) realiza su parte como agente reductor (Lu et al., 2013). Es importante mencionar que se han realizado estudios con diferentes metales en presencia de peróxido de hidrógeno con el fin de observar

su descomposición; mediante estos estudios fue posible determinar que el cobre actúa como catalizador, con una actividad catalítica elevada por lo que la oxidación mediante este protocolo resultó más eficiente (Hojo, Shirai, Chujo, & Hayashi, 1978). De acuerdo con un estudio previo, el porcentaje de grupos carbonilo obtenidos después de la oxidación de PVA en presencia de Cu es aproximadamente de 3 CO/100 GU (Lu et al., 2013) a diferencia del valor obtenido en este estudio que presenta un valor de 0.65 CO/100 GU.

Las diferencias observadas con el valor reportado en la literatura se pueden explicar por las diferencias en el método de oxidación propuesto versus el realizado, se añaden 100 g de PVA en polvo en una solución de H₂O₂ al 21% mientras que la preparación usada utiliza una concentración de H₂O₂ del 15%, se conoce que la concentración de peróxido de hidrógeno tiene un efecto significativo en su capacidad de oxidación (Hebeish, Abdel-Gawad, Basily, & El-Bazza, 1985). El tiempo de reacción también es importante, pues un estudio previo determinó que la mayor cantidad de grupos funcionales carbonilos fueron obtenidos en un tiempo estimado de 60 minutos, que difiere con el tiempo en el cual se realizó la oxidación. Finalmente el valor del pH fue regulado a un valor de 7; sin embargo, se sugiere que el pH óptimo para la obtención de grupos carbonilos se da en un medio ácido aproximado de pH 5 (Lu et al., 2013). Es importante recalcar que ambos métodos permiten oxidar el PVA. Debido a los resultados obtenidos con el PVA de grado de hidrólisis 86.7-88.7% se definió utilizar un mayor grado de hidrólisis como nueva variable.

Cabe mencionar que cuando se realiza la oxidación del PVA en condiciones oxidantes más fuertes se degrada considerablemente. Para la elaboración de hidrogeles, la presencia de 0.65 CO/100 GU debería ser suficiente para el entrecruzamiento entre el PVAox y el quitosano mediante la formación de la base de Schiff. Se han realizado estudios previos para

cuantificar la cantidad de carbonilos presentes en almidón, de diferentes fuentes, donde se observan una cuantificación de grupos carbonilo significativamente menor, por ejemplo la oxidación de almidón de casava reportó un valor de 0.09 CO/100GU (Erazo, 2018) valor inferior al reportado en el PVA previo a su oxidación.

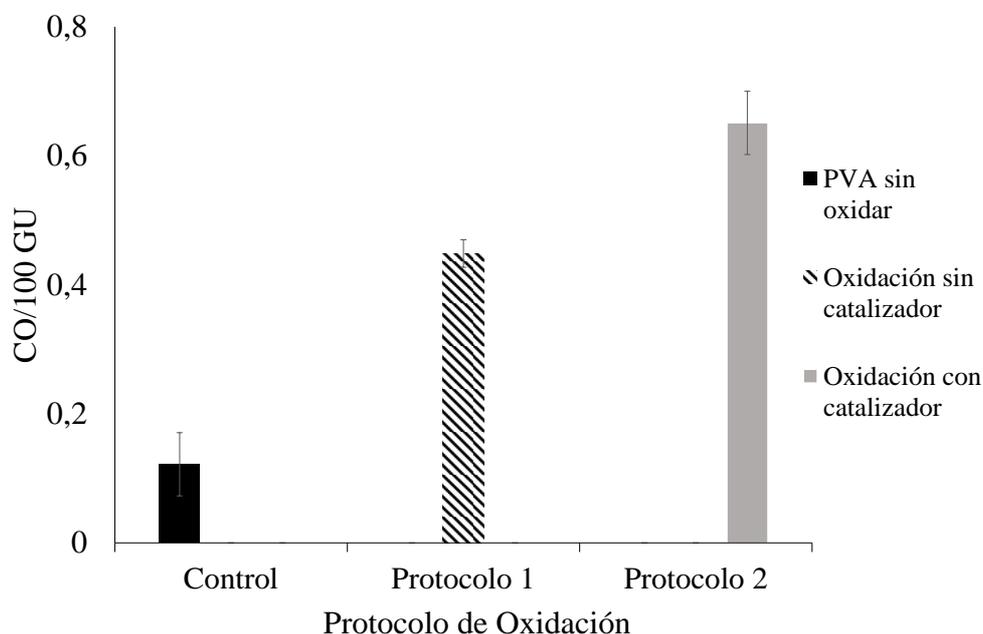


Figura 1: Comparación de métodos de oxidación según la cantidad de grupos carbonilo. El grupo de control corresponde al PVA previo a la oxidación, el protocolo 1 representa la oxidación con H_2O_2 y el protocolo 2 la oxidación con H_2O_2 y $CuSO_4$.

3.2. Análisis morfológico de los hidrogeles

Como primera aproximación es importante observar la morfología del hidrogel en su escala macroscópica. En este sentido, en la Figura 2 se puede observar una comparación de la estructura obtenida para los hidrogeles según la proporción añadida de cada solución. Se puede observar una forma con mejor definición para aquellas muestras que presentan una mayor proporción de la solución de quitosano, es decir 1:2 (sin importar su concentración), como se muestra en la Figura 2 (A). Un fenómeno similar fue observado en los hidrogeles que presentaban igual proporción entre las soluciones de alcohol polivinílico oxidado y quitosano (1:1). Por otra parte la Figura 2 (B) muestra un hidrogel mucho menos definido

respecto a su forma. En la sección (2) de esta figura se puede apreciar de mejor manera como el hidrogel con proporción mayor de quitosano presenta una estructura mucho más compacta (A2), a diferencia de aquel que presenta una proporción mayor de PVAox donde se puede observar como el hidrogel pierde su forma cuando es sostenido con la espátula.

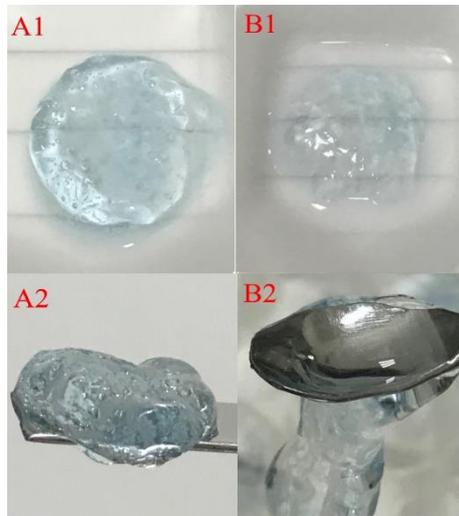


Figura 2: Morfología de los hidrogeles en escala macroscópica. (A) Mayor proporción de quitosano 1:2. (B) Mayor proporción de PVAox. 2:1

Con el fin de observar la estructura del hidrogel de manera microscópica se realizó la caracterización mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Los resultados obtenidos para las formulaciones de hidrogeles que se mostraron más estables en la caracterización por hinchamiento (Ver sección 3.3) se muestran en la figura 3.

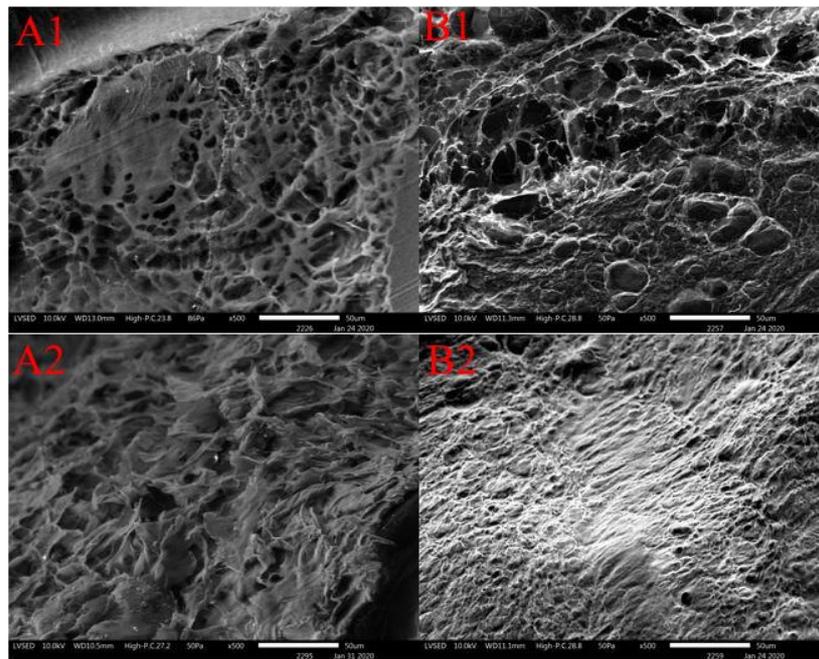


Figura 3: Micrografías electrónicas de hidrogeles a 500x. (A) Grado de hidrólisis de PVA bajo. (B) Grado de hidrólisis de PVA alto. (1) Quitosano al 1%. (2) Quitosano al 1.5%. Barra de calibración: 50µm.

En la Figura 3 se puede observar la presencia de porosidad en todas las muestras de los hidrogeles, a pesar de que esta no es completamente regular, pues se puede presenciar diferentes tamaños de poro. Por otra parte la Figura 3 (A1), se observa una porosidad un poco más regular al igual que en la (B1) mientras que en la Figura 3 (B2) se presencia una zona bastante lisa en el centro y la aparición de algunos poros en sus alrededores. Como se puede presenciar en la Figura 3 (A1) y (B1), el grado de hidrólisis del PVA parece ser el responsable de mantener la uniformidad de los poros, sin embargo su tamaño varía con una aparente relación a la concentración de quitosano, al comparar ambas concentraciones de quitosano para el PVA con grado de hidrólisis alto (B1) y (B2), se observa una morfología significativamente diferente, sin embargo la misma concentración de quitosano (1.5%) en el grado de hidrólisis bajo (A2), los poros son bastante uniformes. Por lo tanto se puede intuir que la porosidad parece tener relación con el grado de hidrólisis de PVA, que puede tener

relación con el peso molecular del mismo. Es relevante estudiar la porosidad cuando se desarrolla hidrogeles debido a que esto permite conocer algunas de las características del hidrogel; una de ellas corresponde al hinchamiento de este material. Se conoce que aquellos hidrogeles que presentan una morfología porosa, donde sus poros se encuentran interconectados presentan mejores propiedades de hinchamiento y, potencialmente, liberación controlada de fármacos (Salerno, Borzacchiello, & Netti, 2011). Como se mencionó anteriormente, el hidrogel PLQ1-C, observado en la Figura 3 (A1), presenta una estructura porosa relativamente regular, con un tamaño de poro menor a 50 μm al igual que el hidrogel PHQ1-C. El tamaño de poro ideal depende de la aplicación del biomaterial; en el caso específico de la liberación controlada de fármacos, el tamaño del poro se ve limitado por el tamaño de las moléculas del fármaco; sin embargo, se aproxima que en promedio este debe encontrar en valor inferior a 10 μm (Loca, Locs, Dubnika, Zalite, & Berzina-Cimdina, 2015). En este estudio no se presenta una cuantificación del tamaño de poro de los hidrogeles, por lo que solamente se conoce que su tamaño se encuentra por debajo de 50 μm . Debido a que este estudio no propone el uso de un fármaco modelo específico, no es posible determinar un valor apropiado para el tamaño de poro que sea útil, por lo que los resultados solo se tomarán en consideración en relación a la caracterización por hinchamiento.

3.3. Estudio de estabilidad de hidrogeles

En la Figura 4 se presentan los espectros FTIR para los hidrogeles obtenidos con las formulaciones PLQ1 (A1), PLQ1.5 (B1), PHQ1 (B1), PHQ1.5 (A2) mostrando también sus diferentes proporciones, los cuales permitieron analizar la formación de la base de Schiff cuando reacciona el PVA oxidado con el quitosano.

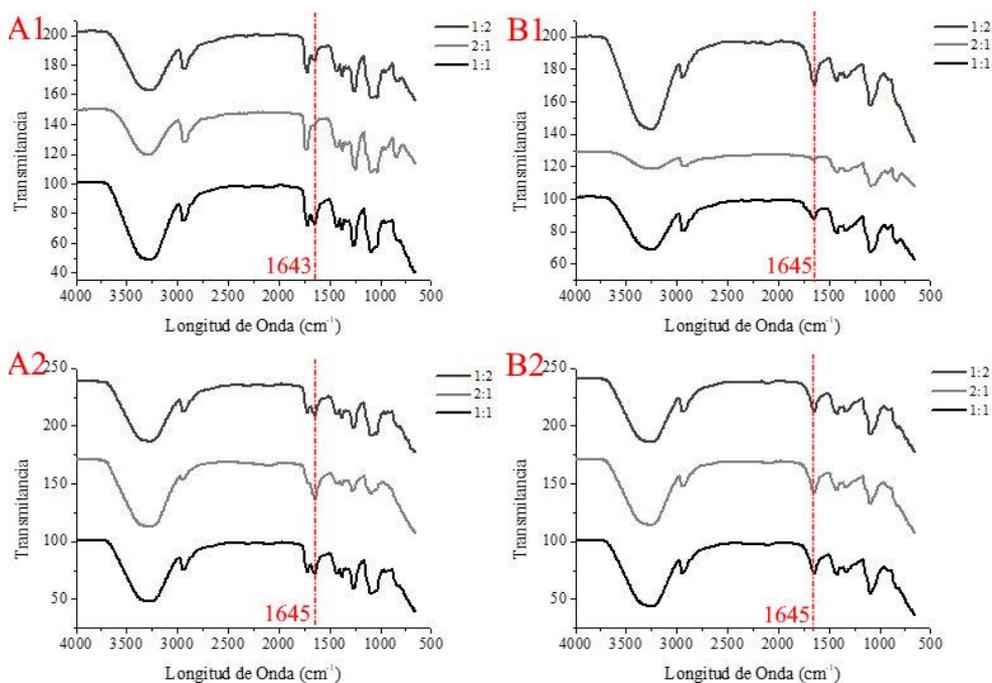


Figura 4: FTIR de hidrogeles con quitosano al 1% (1) y 1.5% (2) en combinación con PVAox a diferentes niveles. (A) Grado de hidrólisis bajo. (B) Grado de hidrólisis alto

En la Figura 4 se observa la presencia del grupo funcional imina (conocido como base de Schiff) en el caso del grado de hidrólisis bajo con quitosano al 1% (PLQ1) Figura 4 (A1) en el hidrogel de proporción 2:1 no se observa la presencia del pico en la longitud onda 1643 cm^{-1} , a diferencia de las otras dos proporciones donde se puede observar este pico. De igual manera para el hidrogel PHQ1 presentado en la Figura 4 (B1) se observa la presencia de una Base de Schiff en el pico 1645 cm^{-1} menos en la proporción 2:1 donde no existe este pico. En lo que respecta a los hidrogeles con concentración de quitosano al 1.5% en ambos niveles del PVAox Figura 4 (A2) y (B2) se puede observar la presencia del pico en la longitud de onda de 1645 cm^{-1} en todas sus proporciones, por lo que se presencia la existencia de un grupo funcional imina.

Si se toma en consideración la estructura macroscópica Figura 2, y se relaciona con el espectro obtenido en la secciones (A1) y (B1) de la figura Figura 4, se puede inferir que cuando la proporción de PVAox en el hidrogel es mayor que la de quitosano, se observa una

perturbación en las cualidades del hidrogel. Este fenómeno se puede ver explicado debido a que no existen suficientes grupos funcionales amina para reaccionar con los grupos carbonilo presentes en la estructura del PVAox, por lo que es posible que la proporción 1:2 en la que se añade mayor cantidad de quitosano al sistema, presencie la base de Schiff en todos sus espectros.

Es importante notar que el grupo funcional imina se encuentra presente en la misma longitud de onda para todos los hidrogeles que presentan este pico, conociendo también que este grupo funcional aparece en un rango aproximado de $1640\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$ (Kaya, Sandal, & Karaer, 2019), por lo que la vibración en esta longitud de onda se considera atribuida al enlace $\text{C}=\text{N}$ formado por la amina presente en el quitosano y el grupo funcional carbonilo del PVAox. Las otras bandas encontradas en los espectros corresponden al grupo OH, presente en la longitud de onda 3300 cm^{-1} , los grupos CH observados en 2917 cm^{-1} , en el pico 1734 cm^{-1} se observa la posible presencia del grupo $\text{C}=\text{O}$ que también puede reflejar el grupo ester.

Con el fin de intentar predecir cómo será la cinética de liberación del fármaco y evaluar la estabilidad del hidrogel, es necesario realizar una prueba de hinchamiento, pues esta propiedad refleja el comportamiento de difusión respecto a la matriz del hidrogel (Carbinatto, de Castro, Evangelista, & Cury, 2014). Es importante conocer que el hinchamiento se verá afectado por la rigidez del material, su porosidad, su tipo de entrecruzamiento y otras propiedades. Otros factores que pueden afectar la estabilidad del hidrogel corresponden al pH y temperatura del medio además del tiempo de entrecruzamiento (Ahmed, 2013).

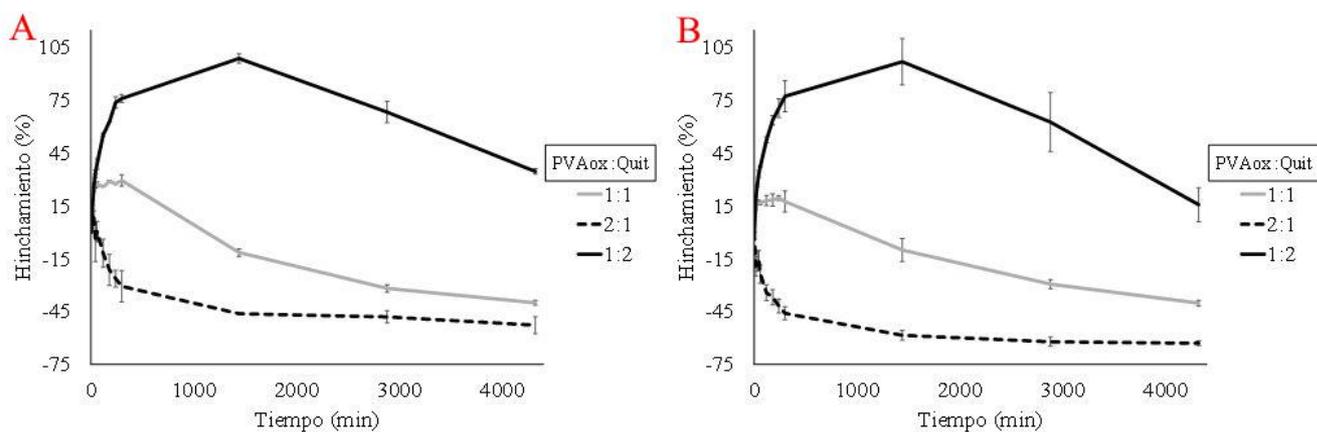


Figura 5: Curva de hinchamiento de hidrogeles con grado de hidrólisis bajo en diferentes proporciones. (A) Quitosano al 1%. (B) Quitosano al 1.5%

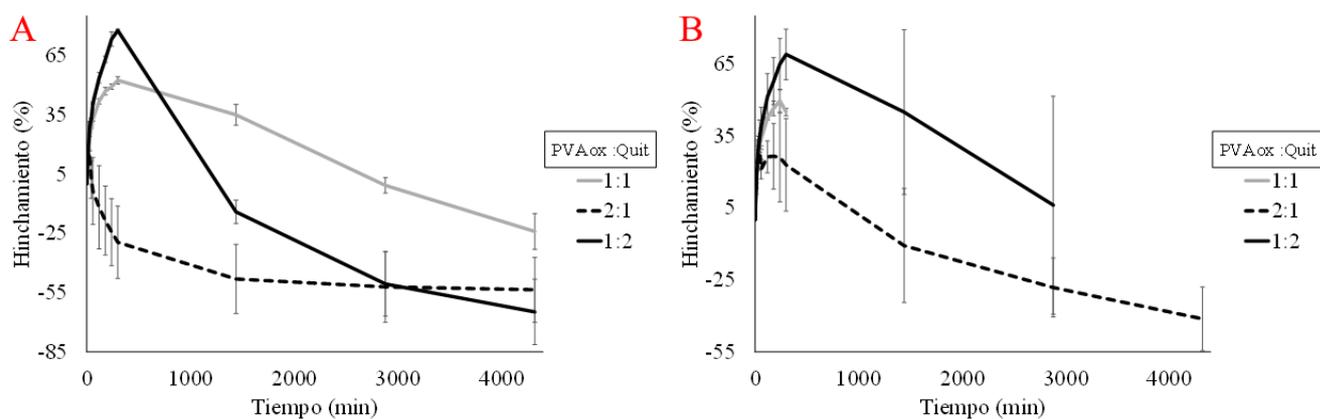


Figura 6: Curva de hinchamiento de hidrogeles con grado de hidrólisis alto en diferentes proporciones. (A) Quitosano al 1%. (B) Quitosano al 1.5%. Nota: las curvas incompletas corresponden a hidrogeles que se desintegraron significativamente después del último tiempo reportado, y no pudieron ser pesados a partir de ese punto.

En la Figura 5 se puede observar que la proporción con mayor cantidad de quitosano, es decir 1:2, tiene una mayor estabilidad en función del tiempo y presenta un incremento en su porcentaje de hinchamiento, y a la vez mantiene su forma definida. Por otra parte en la Figura 6, se pueden observar tendencias ligeramente similares a las de las formulaciones anteriores, considerando que la única variable entre las mismas corresponde al grado de hidrólisis del PVAox.

Se puede observar en la Figura 5 (A) y (B), que el valor máximo de hinchamiento, alcanzado por ambas es en el tiempo de 1440 minutos, y equivale a 98.85% y 97.02% respectivamente, por lo que se observa un comportamiento similar entre ellas. Las curvas correspondientes a las proporciones 1:1 se pueden ver ligeramente estables en un inicio pero pierden su propiedad de hinchamiento y empiezan a deshidratarse, por lo que se reportan valores de hinchamiento negativos, al perder peso respecto al peso inicial. En la Figura 6 (A) y (B) se observa una tendencia similar, pues en ambos casos la proporción 1:2 alcanza el mayor porcentaje de hinchamiento con un valor de 77.58% y 68.92% respectivamente, en un tiempo de 300 minutos. Es importante notar que en la Figura 6 la curva de proporción 1:1 solo alcanzó un tiempo máximo de 300 minutos, debido a que el material se desintegró después de este tiempo, de igual manera la proporción 1:2 alcanzó un tiempo de 3000 minutos antes de desintegrarse. Los hidrogeles formados con el PVA de grado de hidrólisis alto, muestran una mayor desviación entre sus réplicas a diferencia del grado de hidrólisis bajo, donde la desviación se observa disminuida.

La concentración del quitosano no parece tener un aporte significativo en la estabilidad del hidrogel, tendencia que se corrobora mediante el análisis estadístico pues el factor quitosano muestra no ser significativo con un valor p mayor a 0.05 (Anexo C), por otra parte las otras 3 variables de entrada (tiempo, grado de hidrólisis de PVA y proporción) muestran ser significativas en el modelo, por lo tanto al comparar la Figura 5 y la Figura 6 se puede determinar una diferencia significativa entre el hinchamiento según el grado de hidrólisis del PVAox. Estudios anteriores han concluido que la formación de biomateriales con PVA estará afectada por el peso molecular y el grado de hidrólisis, se ha definido que un grado de hidrólisis más bajo resulta en un material más flexible y que un mayor peso

molecular concluye en una mayor resistencia a la tensión (Limpan, Prodpran, Benjakul, & Prasarpran, 2012).

En términos generales los hidrogeles correspondientes a la proporción 2:1 en relación PVAox:Quitosano en todas las formulaciones presentaron una curva de hinchamiento bastante deficiente, como se mencionó anteriormente uno de los posibles motivos para que esto ocurra puede deberse a la falta de grupos funcionales amino para la formación del enlace imina. Se ha determinado que la presencia de peróxido de hidrógeno tiene un efecto reductor en la cantidad de grupos funcionales amina (Qin, Du, & Xiao, 2002), debido a que la oxidación del PVA fue realizada con este compuesto como agente oxidante, podría ser que existen trazas del mismo y al estar esta solución en mayor proporción, afectar la disponibilidad de este grupo, pues en la Figura 4 (A1) y (B1) no existe la formación de este enlace.

Es importante notar que la estabilidad de los hidrogeles está dada por un conjunto de factores, pues como se observa en la Figura 4 (A2) y (B2), todas las formulaciones, muestran la formación de una base de Schiff, sin embargo al momento de realizar la caracterización por hinchamiento (Figura 6), las propiedades de la misma no son eficientes, esto puede verse relacionado con la porosidad de estas muestras como se presencia en la Figura 3 (B2), donde existe una baja porosidad, por lo que no existe una buena difusión del fluido. Ambos hidrogeles presentan curvas de hinchamiento mucho más estables en relación al tiempo, debido a que la porosidad es uno de los factores más importantes en lo que respecta a la absorción de fluidos (Guilherme et al., 2015).

El análisis estadístico ANOVA (Anexo C) muestra que además de que existe un efecto significativo, por parte de las variables de entrada también existen interacciones significativas para el modelo, las interacciones dobles con un valor p menor a 0.05

corresponden a las combinaciones de PVAox con cada una de las otras variables, demostrando así que a pesar de que la concentración de quitosano muestra no ser significativa, su interacción con el quitosano si lo es, posiblemente por la formación del grupo funcional imina. Otras de las interacciones dobles significativas corresponden al quitosano con el tiempo y la proporción con el tiempo, demostrando que la variable de entrada tiempo es significativa en el porcentaje de hinchamiento. El ANOVA muestra la existencia de las interacciones triples, definiendo la importancia de la interacción entre el grado de hidrólisis del PVAox, la concentración de quitosano y la proporción, mostrada en la Figura 5 y Figura 6 mediante las significativas diferencias en el grado de hinchamiento.

Las propiedades de hinchamiento presentadas por los hidrogeles PLQ1-C y PLQ1.5-C presentan propiedades bastante prometedoras, pues se considera que una buena propiedad de hinchamiento corresponde a un incremento de 10-20 veces su peso, además un estudio previo sobre hidrogeles de PVA con quitosano y glutaraldehído como agente entrecruzante, con aplicación a liberación controlada, presentan porcentajes de hinchamiento en un rango de 90-400% valores que se ven afectados por el pH del medio además de la concentración de agente entrecruzante (Matty & MohiALDeen, 2018), considerando que el presente estudio no contempla el uso de un agente entrecruzante adicional, los hidrogeles mencionados podrían ser estudiados para la liberación controlada de fármacos.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La oxidación del alcohol polivinílico obtuvo resultados favorables en presencia y ausencia del catalizador CuSO_4 ; sin embargo, existe una mejora notoria cuando se agrega este catalizador a la reacción, mejorando la presencia del grupo carbonilo en este compuesto. Un posible estudio respecto a la variación en el contenido de este grupo funcional al variar el

grado de hidrólisis es sugerido, pues esta puede ser una fuente de variación significativa. La modificación de este polímero significa una posible nueva gama de biomateriales, pues se demostró que algunas de las propiedades de este material se ven mejoradas. Debido a la relación entre los grupos funcionales carbonilo y carboxilo se propone realizar una cuantificación del grupo funcional carboxilo.

Inicialmente, y en relación a estudios previos, se consideraba que la concentración de quitosano presentaría un efecto significativo en la propiedad de hinchamiento sin embargo se demostró que este incremento, estadísticamente no fue significativo. La formación de hidrogeles mediante estos dos polímeros permitió formar una base de Schiff y por lo tanto fue posible la generación de hidrogeles con entrecruzamiento de tipo químico sin agregar un agente entrecruzante adicional, de todas formas existen otros parámetros que tienen influencia respecto a la estabilidad del hidrogel como el tamaño de poro, además de las interacciones entre las variables de entrada del sistema.

Se recomienda realizar un análisis cuantitativo del tamaño de poro presente en los hidrogeles, para determinar de manera más exacta si este biomaterial puede ser útil en la aplicación de la liberación controlada de fármacos. Las pruebas de hinchamiento demostraron que los hidrogeles PLQ1-C, PLQ1.5-C, PHQ1-C y PHQ1.5-C alcanzaron los mayores valores de hinchamiento, sin embargo solo los hidrogeles PLQ1-C y PLQ1.5-C demostraron una mayor estabilidad en el tiempo. Las curvas de hinchamiento obtenidas para algunas formulaciones parecen ser viables para la aplicación en la liberación controlada de fármacos. Se sugiere realizar un estudio respecto al tiempo de entrecruzamiento de los hidrogeles para determinar si el tiempo utilizado de 20 horas es óptimo.

5. REFERENCIAS

- Abdel-Mohsen, A. M., Aly, A. S., Hrdina, R., Montaser, A. S., & Hebeish, A. (2011). Eco-Synthesis of PVA/Chitosan Hydrogels for Biomedical Application. *Journal of Polymers and the Environment*, 19(4), 1005–1012. <https://doi.org/10.1007/s10924-011-0334-0>
- Ahmed, E. M. (2013). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>
- Altinisik, A., & Yurdakoc, K. (2014). Chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogels for amoxicillin release. *Polymer Bulletin*, 71(3), 759–774. <https://doi.org/10.1007/s00289-013-1090-1>
- Barbucci, R. ed. (2009). *Hydrogels: Biological Properties and Applications*. Milano: Springer Milan.
- Caccavo, D., Cascone, S., Lamberti, G., Barba, A. A., & Larsson, A. (2016). Swellable Hydrogel-based Systems for Controlled Drug Delivery. In *Smart Drug Delivery System*. InTech. <https://doi.org/10.5772/61792>
- Carbinatto, F. M., de Castro, A. D., Evangelista, R. C., & Cury, B. S. F. (2014). Insights into the swelling process and drug release mechanisms from cross-linked pectin/high amylose starch matrices. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.12.002>
- Clarke, J. T., & Blout, E. R. (1946). Nature of the carbonyl groups in polyvinyl alcohol. *Journal of Polymer Science*, 1(5), 419–428. <https://doi.org/10.1002/pol.1946.120010509>
- Denisov, E., Sarkisov, O., & Likhtenshtin, G. (2003). Reactions of ions and radical ions. *Chemical Kinetics*, 250–304. <https://doi.org/10.1016/B978-044450938-3/50030-2>
- Erazo, A. (2018). Synthesis and Characterization of Hydrogels based on Poly(vinyl alcohol) and Modified Starch as Carriers for Controlled Drug Delivery. Trabajo de Titulación. Universidad San Francisco de Quito

- Gaaz, T. S., Sulong, A. B., Akhtar, M. N., Kadhum, A. A. H., Mohamad, A. B., Al-Amiery, A. A., & McPhee, D. J. (2015, December 19). Properties and applications of polyvinyl alcohol, halloysite nanotubes and their nanocomposites. *Molecules*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules201219884>
- Ganji, F., & Vasheghani-Farahani, E. (2013). *Hydrogels in Controlled Drug Delivery Systems The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells View project Micro-encapsulation of API for Sustained Release View project*. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/247151551>
- Gómez-Ríos, D., Barrera-Zapata, R., & Ríos-Esteva, R. (2017). Comparison of process technologies for chitosan production from shrimp shell waste: A techno-economic approach using Aspen Plus ®. *Food and Bioprocess Processing*, 103, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.02.010>
- Guilherme, M. R., Aouada, F. A., Fajardo, A. R., Martins, A. F., Paulino, A. T., Davi, M. F. T., ... Muniz, E. C. (2015, April 22). Superabsorbent hydrogels based on polysaccharides for application in agriculture as soil conditioner and nutrient carrier: A review. *European Polymer Journal*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.04.017>
- Hamedi, H., Moradi, S., Hudson, S. M., & Tonelli, A. E. (2018, November 1). Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.114>
- Hassan, C. M., & Peppas, N. A. (2000). Structure and Morphology of Freeze/Thawed PVA Hydrogels. *Macromolecules*, 33(7), 2472–2479. <https://doi.org/10.1021/ma9907587>
- Hebeish, A., Abdel-Gawad, I. I., Basily, I. K., & El-Bazza, S. (1985). Degradation of poly(vinyl alcohol) in strongly alkaline solutions of hydrogen peroxide. *Journal of*

Applied Polymer Science, 30(6), 2321–2327.

<https://doi.org/10.1002/app.1985.070300605>

Hojo, N., Shirai, H., Chujo, Y., & Hayashi, S. (1978). CATALYTIC ACTIVITY OF Cu(II)-POLY(VINYL ALCOHOL) COMPLEX FOR DECOMPOSITION OF HYDROGEN PEROXIDE. *J Polym Sci Polym Chem Ed*, 16(2), 447–455.

<https://doi.org/10.1002/pol.1978.170160215>

Iannace, S., Sorrentino, L., & Di Maio, E. (2014). Biodegradable biomedical foam scaffolds. In *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications* (pp. 163–187). Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1533/9780857097033.1.163>

Jiang, S., Liu, S., & Feng, W. (2011). PVA hydrogel properties for biomedical application. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(7), 1228–1233.

<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.04.005>

Jiang, T., James, R., Kumbar, S. G., & Laurencin, C. T. (2014). Chitosan as a Biomaterial: Structure, Properties, and Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery. In *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* (pp. 91–113). Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396983-5.00005-3>

Kandra, P., Challa, M. M., & Kalangi Padma Jyothi, H. (2012, January). Efficient use of shrimp waste: Present and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3651-2>

Kaya, İ., Sandal, B. S., & Karaer, H. (2019). Synthesis, characterization and electrochemical properties of poly(phenoxy-imine)s containing peril and tert-butyl units. *Journal of King Saud University - Science*, 31(1), 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.06.008>

Laftah, W. A., Hashim, S., & Ibrahim, A. N. (2011, October). Polymer hydrogels: A review. *Polymer - Plastics Technology and Engineering*.

<https://doi.org/10.1080/03602559.2011.593082>

- Li, J., & Mooney, D. J. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials*. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>
- Limpan, N., Prodpran, T., Benjakul, S., & Prasarpran, S. (2012). Influences of degree of hydrolysis and molecular weight of poly(vinyl alcohol) (PVA) on properties of fish myofibrillar protein/PVA blend films. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.03.007>
- Loca, D., Locs, J., Dubnika, A., Zalite, V., & Berzina-Cimdina, L. (2015). Porous hydroxyapatite for drug delivery. In *Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications* (pp. 189–209). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-1-78242-033-0.00009-2>
- Lu, Y., Kong, Q. M., Jing, R., Hu, X., & Zhu, P. X. (2013). Solid state oxidation of polyvinyl alcohol by hydrogen peroxide-Cu (II). *Polymer Degradation and Stability*, 98(6), 1103–1109. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2013.03.022>
- Ma, S., Wang, S., Li, Q., Leng, Y., Wang, L., & Hu, G. H. (2017). A Novel Method for Preparing Poly(vinyl alcohol) Hydrogels: Preparation, Characterization, and Application. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 56(28), 7971–7976. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b01812>
- Mahinroosta, M., Jomeh Farsangi, Z., Allahverdi, A., & Shakoori, Z. (2018). Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. *Materials Today Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.02.004>
- Maitra, J., & Shukla, V. K. (2014). Cross-linking in Hydrogels - A Review. *American Journal of Polymer Science*, 4(2), 25–31. <https://doi.org/10.5923/j.ajps.20140402.01>
- Matty, F. S., & MohiALDeen, Z. M. (2018). Swelling Behavior and Drug Release of Interpenetrating Network Composed of PVA and Chitosan. *Ibn AL- Haitham Journal*

For Pure and Applied Science, 31(1), 145. <https://doi.org/10.30526/31.1.1861>

Mohebbi, S., Nezhad, M. N., Zarrintaj, P., Jafari, S. H., Gholizadeh, S. S., Saeb, M. R., & Mozafari, M. (2019). Chitosan in Biomedical Engineering: A Critical Review. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 14(2), 93–116.

<https://doi.org/10.2174/1574888X13666180912142028>

Nkhwa, S., Lauriaga, K. F., Kemal, E., & Deb, S. (2014). Poly(vinyl alcohol): Physical Approaches to Designing Biomaterials for Biomedical Applications. *Conference Papers in Science*, 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/403472>

Qin, C. Q., Du, Y. M., & Xiao, L. (2002). Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, 76(2), 211–218. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(02\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00016-2)

Rodríguez-Rodríguez, R., García-Carvajal, Z. Y., Jiménez-Palomar, I., Jiménez-Avalos, J. A., & Espinosa-Andrews, H. (2019). Development of gelatin/chitosan/PVA hydrogels: Thermal stability, water state, viscoelasticity, and cytotoxicity assays. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(10), 47149. <https://doi.org/10.1002/app.47149>

Safdar, R., Omar, A. A., Arunagiri, A., Regupathi, I., & Thanabalan, M. (2019, February 1). Potential of Chitosan and its derivatives for controlled drug release applications – A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. Editions de Sante. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.10.020>

Salerno, A., Borzacchiello, R., & Netti, P. A. (2011). Pore structure and swelling behavior of porous hydrogels prepared via a thermal reverse-casting technique. In *Journal of Applied Polymer Science* (Vol. 122, pp. 3651–3660). <https://doi.org/10.1002/app.34778>

Takayama, G. (1960). Oxidation and Degradation of Polyvinyl Alcohol by hydrogen Peroxide. *Kobunshi Kagaku*, 17(187), 698–702.

<https://doi.org/10.1295/koron1944.17.698>

Thapa, B., & Narain, R. (2016). Mechanism, current challenges and new approaches for non viral gene delivery. In *Polymers and Nanomaterials for Gene Therapy* (pp. 1–27).

Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100520-0.00001-1>

Xu, J., Liu, Y., & Hsu, S. (2019). Hydrogels Based on Schiff Base Linkages for Biomedical Applications. *Molecules*, 24(16), 3005. <https://doi.org/10.3390/molecules24163005>

6. ANEXOS

6.1. ANEXO A: ANOVA PARA MÉTODOS DE OXIDACIÓN

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Protocolo	Fixed	3	Blanco; Con Catalizador; Sin Catalizador

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Protocolo	2	0,42770	0,213848	33,54	0,001
Error	6	0,03825	0,006375		
Total	8	0,46595			

6.2. ANEXO B: COMPARACIÓN POR MÉTODO DE TUKEY PARA Tukey Pairwise Comparisons: Protocolo

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

<u>Protocolo</u>	<u>N</u>	<u>Mean</u>	<u>Grouping</u>
Con Catalizador	3	0,651037	A
Sin Catalizador	3	0,448617	B
Blanco	3	0,121905	C

Means that do not share a letter are significantly different.

6.3. ANEXO C: ANOVA PARA PRUEBA DE HINCHAMIENTO

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
PVAox	Fixed	2	Alto; Bajo
Quitosano	Fixed	2	1,0; 1,5
Proporción	Fixed	3	1:1; 1:2; 2:1
Tiempo	Fixed	11	15; 30; 45; 60; 120; 180; 240; 300; 1440; 2880; 4320

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
PVAox	1	2521	2521,3	26,24	0,000
Quitosano	1	286	285,9	2,98	0,087
Proporción	2	126287	63143,7	657,16	0,000
Tiempo	10	47997	4799,7	49,95	0,000
PVAox*Quitosano	1	6142	6141,6	63,92	0,000
PVAox*Proporción	2	31646	15823,1	164,68	0,000
PVAox*Tiempo	10	5735	573,5	5,97	0,000
Quitosano*Proporción	2	405	202,4	2,11	0,125
Quitosano*Tiempo	10	2969	296,9	3,09	0,001
Proporción*Tiempo	20	38711	1935,5	20,14	0,000
PVAox*Quitosano*Proporción	2	4547	2273,3	23,66	0,000
PVAox*Quitosano*Tiempo	10	1852	185,2	1,93	0,046
PVAox*Proporción*Tiempo	20	21952	1097,6	11,42	0,000
Quitosano*Proporción*Tiempo	20	3170	158,5	1,65	0,049
Error	144	13836	96,1		
Lack-of-Fit	16	2738	171,1	1,97	0,019
Pure Error	128	11098	86,7		
Total	255	372314			

6.4. ANEXO D: COMPARACIÓN POR MÉTODO DE TUKEY PARA PRUEBA DE HINCHAMIENTO

Tukey Pairwise Comparisons: PVAox

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

PVAox	N	Mean	Grouping
Alto	124	17,4309	A
Bajo	132	10,2828	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Proporción

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Proporción	N	Mean	Grouping
1:2	86	38,8076	A
1:1	82	19,4678	B
2:1	88	-16,7048	C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Tiempo

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tiempo	N	Mean	Grouping
240	24	30,1553	A
300	24	30,0877	A
180	24	28,1491	A B
120	24	25,7783	A B
60	24	21,7446	A B C
45	24	20,7359	B C
30	24	19,3933	B C
15	24	13,3291	C
1440	22	12,7439	C
2880	22	-10,7866	D
4320	20	-38,9048	E

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: PVAox*Quitosano

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

PVAox*Quitosano	N	Mean	Grouping
Alto 1,5	58	24,2125	A
Bajo 1,0	66	14,6574	B
Alto 1,0	66	10,6493	B
Bajo 1,5	66	5,9082	C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: PVAox*Proporcion

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

PVAox*Proporcion	N	Mean	Grouping
Bajo 1:2	44	51,8000	A
Alto 1:1	38	30,6003	B
Alto 1:2	42	25,8153	B
Bajo 1:1	44	8,3352	C
Alto 2:1	44	-4,1229	D
Bajo 2:1	44	-29,2867	E

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: PVAox*Quitosano*Proporcion

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

PVAox*Quitosano*Proporcion	N	Mean	Grouping
Bajo 1,0 1:2	22	53,1044	A
Bajo 1,5 1:2	22	50,4955	A
Alto 1,5 1:1	16	33,6009	B
Alto 1,5 1:2	20	28,2708	B
Alto 1,0 1:1	22	27,5998	B
Alto 1,0 1:2	22	23,3599	B
Bajo 1,0 1:1	22	11,4453	C
Alto 1,5 2:1	22	10,7660	C
Bajo 1,5 1:1	22	5,2252	C
Alto 1,0 2:1	22	-19,0117	D
Bajo 1,0 2:1	22	-20,5773	D
Bajo 1,5 2:1	22	-37,9960	E

Means that do not share a letter are significantly different.