

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

Formación de hidrogeles de pectina y quitosano utilizando ácido succínico como agente entrecruzante para la liberación controlada de acetaminofén

María Gabriela Quimbiamba Garzón

Ingeniería Química

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

Quito, 19 de diciembre de 2022

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Formación de hidrogeles de pectina y quitosano utilizando ácido succínico como agente entrecruzante para la liberación controlada de acetaminofén

María Gabriela Quimbiamba Garzón

Nombre del profesor, Título académico

José Álvarez, PhD

Nombre del profesor, Título académico

José Mora, PhD

Quito, 19 de diciembre de 2022

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UNPUBLISHED DOCUMENT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

En el presente proyecto de investigación se realizaron hidrogeles de pectina y quitosano con ácido succínico como agente entrecruzante para la liberación controlada de fármacos. El uso de un agente entrecruzante permite obtener un entrecruzamiento químico que mejora, entre otras propiedades, la estabilidad de los hidrogeles. Los agentes entrecruzantes comúnmente utilizados como los dialdehídos son citotóxicos y basan el entrecruzamiento en la formación de bases de schiff que son reversibles, limitando sus aplicaciones. Por lo que se propone el uso del succinato de dimetilo (SD) como agente entrecruzante, para el entrecruzamiento por la formación de enlaces amida. Para lo cual se esterificó el ácido succínico para producir SD que se aplicó a la mezcla de polímeros para formar el hidrogel. Los hidrogeles obtenidos se evaluaron mediante análisis FTIR, prueba de hinchamiento y SEM, para determinar la influencia de la concentración del éster y la composición polimérica en las propiedades del hidrogel y en la liberación controlada. El succinato de dimetilo permitió formar hidrogeles mediante un entrecruzamiento químico, el cual aumentó con el contenido de quitosano y de éster. Esto influyó en el hinchamiento y la morfología. Se alcanzó un mayor grado de hinchamiento en los hidrogeles con más cantidad de pectina y menor concentración de SD debido a una estructura más homogénea y con poros más grandes. Mientras que, se obtuvo un menor grado de hinchamiento en los hidrogeles con más quitosano y éster, por la rigidez de la estructura, y la reducción de la cantidad y el tamaño de los poros. En conclusión, las propiedades de los hidrogeles de pectina-quitosano entrecruzados con SD se pueden ajustar al variar la composición de los polímeros y la cantidad de SD, haciendo de estos materiales potenciales sistemas de liberación controlada de fármacos.

Palabras clave: entrecruzamiento químico, ácido succínico, liberación controlada, succinato de dimetilo, pectina, quitosano.

ABSTRACT

In the present research project, pectin-chitosan hydrogels crosslinked with succinic acid were made for controlled drug delivery. The use of cross-linking agents allows the formation of a chemical cross-linking, which enhance hydrogel properties such as stability. Commonly used crosslinking agents such as dialdehydes are cytotoxic and based the cross-linking in the formation of Schiff bases which are reversible, limiting the applicability of the hydrogels. Therefore, in this work, dimethyl succinate (DS) is used as a cross-linking agent through the formation of amide bond. For this purpose, succinic acid was esterified to produce DS and applied to the polymer mixture to form the hydrogel. The obtained hydrogels were evaluated by FTIR spectrums, swelling test and SEM to define the influence of the polymers proportion and DS concentration on the hydrogels properties and drug delivery. Dimethyl succinate allowed the chemical cross-linking of chitosan and pectin, which increased with the content of chitosan and ester. This had an impact on the swelling degree and on the morphology. The hydrogels reached higher swelling degrees with higher pectin content and lower DS concentration, due to a more homogeneous structure and larger pores. While, with higher content of chitosan the swelling degree decreased because of the reduction of the quantity and size of the pores. In conclusion, the properties of the pectine-chitosan hydrogels crosslinked with DS can be adjusted with the variation of polymer composition and SD concentration, making this materials potential controlled drug delivery systems.

Key words: chemical crosslinking, succinic acid, controlled drug delivery, dimethyl succinate, chitosan, pectin.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	12
Metodología	16
2.1. Preparación de geles con exposición a luz UV	16
2.2. Preparación de geles con succinato de dimetilo (SD).....	16
2.2.1. Esterificación del ácido succínico a succinato de dimetilo.....	16
2.2.2. Preparación de hidrogeles	17
2.3. Análisis FTIR.....	17
2.4. Prueba de hinchamiento	17
2.5. Microscopía electrónica de barrido.....	18
2.6. Encapsulación y liberación de acetaminofén	18
2.7. Análisis estadístico.....	19
Resultados y discusiones.....	19
3.1. Hidrogeles con entrecruzamiento asistido por luz UV	19
3.1.1. Estructura química	19
3.1.2. Estabilidad de los hidrogeles	22
3.2. Hidrogeles entrecruzados con succinato de dimetilo (SD).....	24
3.2.1. Estructura química	25
3.2.2. Estabilidad de los hidrogeles	29
3.2.3. Morfología de los hidrogeles	31
3.2.4. Encapsulación y liberación de acetaminofén.....	32
Conclusiones y recomendaciones	34
Referencias bibliográficas.....	36

Anexos	42
6.1. Espectro completo de los materiales base.....	42
6.2. Espectro del succinato de dimetilo	42
6.3. Espectro FTIR completo de los hidrogeles con SD	43
6.4. Curva de calibración del acetaminofén.....	43
6.5. Resultados de los análisis ANOVA y Tukey	44
6.5.1. Hinchamiento hidrogeles con UV	44
6.5.2. Hinchamiento de los hidrogeles con SD.....	46
6.5.3. Liberación de Acetaminofén.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Códigos de los hidrogeles elaborados bajo luz UV	16
Tabla 2. Formulaciones de los hidrogeles elaborados con succinato de dimetilo (SD)	17
Tabla 3. Valores para la curva de calibración del acetaminofén	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Apariencia de los hidrogeles formados, a) con ácido succínico (HAS/HASUV) y b) con ácido acético (HAA/HAAUV)	20
Figura 2. Espectros FTIR de los materiales base de los hidrogeles. a) Pectina, b) quitosano y c) mezcla física de pectina y quitosano sin tratamiento.	21
Figura 3. Espectros FTIR de los hidrogeles con exposición UV comparados con la mezcla de pectina y quitosano sin tratamiento. a) Hidrogeles realizados con ácido succínico con (HASUV) y sin luz UV (HAS), y b) hidrogeles realizados con ácido acético con (HAAUV) y sin luz UV (HAA)	22
Figura 4. Cinética de hinchamiento para los xerogeles con y sin tratamiento UV, a) con ácido succínico: HASUV y HAS, y b) con ácido acético: HAAUV y HAA.....	23
Figura 5. Hidrogeles formados con SD como agente entrecruzante (Pc.Qt(1:1)/2.3)	24
Figura 6. Espectros de los hidrogeles hechos con diferentes concentraciones de succinato de dimetilo, especificadas en la leyenda, y diferentes proporciones de pectina-quitosano: a) 1:1, b) 2:1 y c) 1:2	26
Figura 7. Espectros FTIR de los diferentes polímeros antes y después de aplicar la metodología con SD	28
Figura 8. Espectros de las mezclas de a) quitosano-alginato y b) quitosano-almidón, a diferentes composiciones antes y después de aplicar la metodología con SD.	29
Figura 9. Grado de hinchamiento de los hidrogles a diferentes composiciones, especificadas en la leyenda, y concentraciones de SD. a) 1.6%, b) 1.8%, c) 2% y d) 2.3%	30
Figura 10. Micrografías electrónicas de barrido para las diferentes formulaciones de hidrogeles. En la primera columna se indica la concentración de SD (1.6-2.3%) y en la	

primera fila, la proporción pectina-quitosano (1:1, 2:1 y 1:2). Barra de calibración: 100 μm.	32
Figura 11. Liberación acumulativa para los hidrogeles al 2% de SD, a diferentes composiciones especificadas en la leyenda.....	33
Figura 12. Espectro FTIR completo de los materiales base.....	42
Figura 13. Espectro del ácido succínico (SA) y el succinato de dimetio (SD).....	42
Figura 14. Espectro completo de los hidrogeles hechos con SD. a) 1:1, b) 2:1 y c) 1:2.	43
Figura 15. Curva de calibración del acetaminofén	44

INTRODUCCIÓN

Los hidrogeles son materiales poliméricos que se forman a partir del entrecruzamiento de redes de polímeros, formando estructuras tridimensionales capaces de hincharse y retener gran cantidad de agua. Debido a esto, además de la posibilidad de ajustar sus propiedades y su capacidad de responder a estímulos ambientales, estos materiales han tomado gran interés para aplicaciones biomédicas [1], [2]. En particular, se puede destacar su uso como sistema de liberación controlada de fármacos. Debido a su habilidad de almacenar compuestos, además de liberarlos a una razón y lugar determinado [3], permiten mejorar la eficacia de los medicamentos, así como reducir la dosis necesaria y la toxicidad que podrían generar en el cuerpo [4].

Esta capacidad de liberación depende del tipo de hidrogel, según su composición y el tipo de entrecruzamiento, estos materiales pueden ser capaces de mantener una administración prolongada y constante. Así, los hidrogeles se pueden componer de uno o más polímeros los cuales pueden ser tanto sintéticos como naturales. Algunos de los polímeros sintéticos que se utilizan son: el alcohol polivinílico (PVA) [5], el polietilenglicol (PEG), el carbopol, la poliacrilamida (PAM) y la carboximetilcelulosa (CMC) [6]. Estos, permiten que los hidrogeles formados puedan absorber mayor cantidad de agua, tengan buenas propiedades mecánicas y un mayor tiempo de vida útil, por lo que su uso es predominante en comparación a los de fuentes naturales [7]. Sin embargo, los polímeros naturales, como la pectina, el quitosano, el almidón, la celulosa, la queratina y el colágeno, presentan otras ventajas significativas como biocompatibilidad, biodegradabilidad y una buena mucoadhesividad [6], cobrando gran interés para su uso en aplicaciones biomédicas.

La pectina (Pc) y el quitosano (Qt) son biopolímeros que se pueden utilizar en la administración de fármacos, en combinación o de manera independiente. La pectina es un polisacárido de ácido galacturónico, que se encuentra en la pared celular de las plantas, y se

extrae principalmente de la cáscara de algunas frutas[8]. Esta es ampliamente empleada en la industria alimenticia como gelificante y espesante [9]. Mientras que, en el área de la biomedicina, se han desarrollado varios biomateriales . Sin embargo, al ser un polímero soluble en agua, los materiales basados en pectina tienen poca durabilidad [9], limitando sus aplicaciones.

Por otro lado, el quitosano es un polisacárido compuesto por N-glucosamina y N-acetil glucosamina, que se obtiene por la desacetilación de la quitina presente en el exoesqueleto de los camarones y otros crustáceos. Este biopolímero además de los beneficios que presentan otros biopolímeros, tiene propiedades antibacteriales y una baja reacción inmunológica [10]. No obstante, es un material insoluble en agua y soluciones orgánicas, y apenas soluble en medio ácido por lo que su uso resulta ser poco práctico [11]. Además, al formar biomateriales como hidrogeles, al ser materiales hidrofílicos, solubles a condiciones ácidas pero insolubles a ciertas condiciones fisiológicas, presentan baja fuerza mecánica y baja capacidad de controlar la liberación de fármacos u otros compuestos [11].

Por estas limitaciones, surge la necesidad de formar complejos con otros polímeros, utilizar agentes entrecruzantes o sintetizar derivados con mejores propiedades para posibilitar el entrecruzamiento y aumentar la estabilidad [12]. Al combinar polímeros se pueden reunir las ventajas de cada polímero y crear compuestos con mayor bioactividad. Tanto la pectina como el quitosano se han utilizado en complejos con otros polímeros para la formación de materiales con diferentes ventajas. Por ejemplo, se han reportado hidrogeles de pectina-polivinilpirrolidona que muestran hinchamiento y liberación controlada con sensibilidad al pH [13], la misma sensibilidad se obtuvo con hidrogeles de pectina-poliacrilonitrilo, además de presentar hinchamiento y deshinchamiento reversible [14]. Así mismo, se ha utilizado el carboximetil quitosano junto con la nanocelulosa en la elaboración de hidrogeles inyectables, autocurativos y capaces de mantener el crecimiento celular [15].

De la misma manera, la pectina y el quitosano debido a su naturaleza como polianión y polication, respectivamente, son capaces de formar hidrogeles por interacciones iónicas. Interacciones que se pueden deshacer por la protonación y deprotonación de los grupos funcionales de los polielectrolitos [16], lo cual disminuye su estabilidad y sus potenciales aplicaciones. Para abordar esta delimitante del entrecruzamiento físico, se utilizan diferentes procesos de entrecruzamiento como la síntesis de derivados de los biopolímeros y el empleo de agentes entrecruzantes. Estos procesos promueven la interacción entre las cadenas poliméricas y la formación de enlaces covalentes para un entrecruzamiento químico.

La radiación con luz UV es uno de los métodos que producen un entrecruzamiento, por fotooxidación mediante la generación de radicales que pueden reaccionar y ayudar en el entrecruzamiento de las cadenas de polímeros [17]. Por otro lado, también se ha demostrado que la luz UV se puede aplicar para modificar el pKa de algunos ácidos alterando las propiedades de los compuestos [18]. Puesto que los biopolímeros utilizados se protonan y deprotonan de acuerdo a su valor de pKa, un cambio en el mismo podría promover un entrecruzamiento químico sobre el físico.

En cuanto a los agentes entrecruzantes, ácidos como el ácido succínico han sido utilizados como agentes entrecruzantes iónicos al proveer de un medio para la disolución del quitosano. El ácido succínico al ser un ácido dicarboxílico tiene una mayor interacción con el quitosano permitiendo mejorar su disolución en comparación con otros ácidos, lo que, a su vez mejora las propiedades de la solución de quitosano y de los materiales formados [19]. Por otra parte, compuestos derivados del ácido succínico también se utilizan como agentes entrecruzantes covalentes, como los ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) que por los grupos éster puede interactuar con los grupos amida del quitosano [20], [21].

Tanto la fotooxidación como el ácido succínico han sido empleados para la elaboración de materiales a base de quitosano favoreciendo el entrecruzamiento de las redes poliméricas

para la formación de hidrogeles [22], [23] y de films [19], [24], [25], respectivamente. Sin embargo, no se encontraron estudios en los que se realice un entrecruzamiento asistido por luz UV mediante un cambio en el pKa, y tampoco el uso del ácido succínico para el entrecruzamiento de pectina y quitosano. Por lo que se plantea la aplicación de la luz UV, del ácido succínico y su éster en la formación de hidrogeles.

De esta manera, en este proyecto se exploran dos rutas para la formación de hidrogeles de pectina y quitosano. En primer lugar, se forman los hidrogeles bajo exposición de luz UV utilizando el ácido succínico (AS) como agente entrecruzante y, en segundo lugar, solamente se utiliza el succinato de dimetilo (SD) como agente entrecruzante. Así, el objetivo principal es elaborar hidrogeles a base de pectina y quitosano con ácido succínico como agente entrecruzante con potencial aplicación en la liberación controlada de fármacos. Para lo cual primero se busca establecer una metodología, evaluar el efecto de la concentración de ácido succínico esterificado y la proporción pectina-quitosano sobre las propiedades de los hidrogeles, y finalmente, estudiar la cinética de la liberación de un fármaco de los hidrogeles formados.

METODOLOGÍA

2.1. Preparación de geles con exposición a luz UV

Para preparar los hidrogeles se diluyó la pectina y se realizó una suspensión de quitosano. Para este caso se empleó ácido acético al 0,5% v/v y ácido succínico al 0,5% p/v. Se prepararon soluciones al 2% p/v tanto de pectina como de quitosano en 10 mL de ácido diluido. La solución de quitosano se expuso a luz UV (254 nm) en una cámara oscura por 10 min antes de agregar la solución de pectina. Las soluciones se mezclaron con agitación constante y se dejó reaccionar por 1 hora bajo luz UV. Pasado el tiempo de reacción, los hidrogeles preparados en ácido acético se recuperaron por centrifugación, por 5 min a 18000 Grados/s. Mientras que los preparados en ácido succínico se separaron del sobrenadante. Se realizaron dos lavados con agua destilada por 20 minutos y se secaron a 40°C.

Tabla 1. Códigos de los hidrogeles elaborados bajo luz UV

Código	Ácido	Luz UV
HASUV	Succínico	Sí
HAS	Succínico	No
HAAUV	Acético	Sí
HAA	Acético	No

2.2. Preparación de geles con succinato de dimetilo (SD)

2.2.1. Esterificación del ácido succínico a succinato de dimetilo

Para la esterificación de ácido succínico se siguió la metodología propuesta por Bart et al, con modificaciones [26]. Se disolvió el ácido succínico en metanol seco en una relación molar de 0.05:0.6 en una manta de calentamiento con agitación constante. Se llevó la solución a 60°C y se agregó ácido sulfúrico a 1% mol con respecto al ácido succínico. Se dejó reaccionar por 1 h a 60°C. Una vez concluido el tiempo de reacción se dejó enfriar y se elevó el pH a 5.5. Finalmente, se conservó a 4°C hasta su uso.

2.2.2. Preparación de hidrogeles

Se preparó soluciones al 4% p/v de polímeros, al disolver pectina y suspender quitosano en diferentes proporciones (1:1, 1:2 y 2:1) en un 1 mL de agua destilada. A estas soluciones, previamente calientes a 60°C, se agregó una alícuota de ácido succínico esterificado para obtener concentraciones finales de ácido de 1.6%, 1.8%, 2% y 2.3% p/v. Se homogenizó la mezcla con la ayuda de un agitador tipo vortex, y se dejó reaccionar por 3 h a 60°C en baño María. Los hidrogeles obtenidos se lavaron dos veces en agua destilada por 20 min y, finalmente, se secaron a 40°C.

Tabla 2. Formulaciones de los hidrogeles elaborados con succinato de dimetilo (SD)

% SD*/Pc:Qt**	1:1	2:1	1:2
1,60%	Pc.Qt(1:1)/1.6	Pc.Qt(2:1)/1.6	Pc.Qt(1:2)/1.6
1,80%	Pc.Qt(1:1)/1.8	Pc.Qt(2:1)/1.8	Pc.Qt(1:2)/1.8
2,00%	Pc.Qt(1:1)/2.0	Pc.Qt(2:1)/2.0	Pc.Qt(1:2)/2.0
2,30%	Pc.Qt(1:1)/2.3	Pc.Qt(2:1)/2.3	Pc.Qt(1:2)/2.3

*Porcentaje de succinato de dimetilo en la solución polimérica en %p/v

**Proporción de pectina y quitosano

2.3. Análisis FTIR

Se realizó espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier de los materiales con el equipo Agilent Cary 630. Los espectros se tomaron con la resolución a 16 s-1 y 128 análisis en la región IR de 600-4000 cm-1.

2.4. Prueba de hinchamiento

Para el estudio de hinchamiento se colocó los hidrogeles secos en PBS a un pH de 7.4, a 37°C en incubación, por 72 horas. Se pesaron los hidrogeles en seco y después a diferentes tiempos (1h, 2h, 3 h, 24 h, 48h y 72h). El grado de hinchamiento se determinó mediante la ecuación 1.

$$\%H = \frac{m_t - m_i}{m_i} \times 100\% \quad (1)$$

Dónde, m_t es la masa del hidrogel en el tiempo t y m_i es la masa inicial del hidrogel seco.

2.5. Microscopía electrónica de barrido

Se realizó microscopía electrónica de barrido de los hidrogeles para estudiar su morfología. Para esto, se congelaron los hidrogeles realizados con SD de las diferentes formulaciones y se liofilizaron. Las muestras se observaron con las magnificaciones x200, x500 y x1000 del microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-IT300 a una presión entre 24-30 Pa y un voltaje de 20 kV.

2.6. Encapsulación y liberación de acetaminofén

La encapsulación se realizó según el protocolo propuesto por Garrido et al. [27]. Se utilizó acetaminofén estándar (Sigma-Aldrich A3035) en una relación de 5% p/p de fármaco con respecto a la cantidad de polímeros. Se mezcló el acetaminofén en la solución polimérica previo al entrecruzamiento, después se agregó el SD, se dejó reaccionar y los hidrogeles con el fármaco encapsulado se secaron a 40°C (xerogeles).

Para la liberación se colocaron los xerogeles en 2 mL de PBS. A tiempos determinados se tomaron alícuotas de 100 μ L que se reemplazaron con solución fresca de PBS. Las alícuotas tomadas se diluyeron en 2 mL con PBS y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV-vis Hanon i5 a 244 nm. Finalmente, la concentración se determinó con la curva de calibración previamente realizada con soluciones de acetaminofén de concentración conocida, y el porcentaje de fármaco liberado se calculó con la ecuación 2 [27]:

$$\%D_t = \frac{D_t - D_{t-1}}{D_0} \times 100\% \quad (2)$$

Dónde, D_t es la masa del fármaco en el tiempo t en mg, D_{t-1} es la cantidad de fármaco liberado acumulada y D_0 es la masa inicial del fármaco.

2.7. Análisis estadístico

Los análisis se realizaron por triplicado ($n=3$) y los resultados se reportan como el promedio \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas se determinaron por análisis de varianza, ANOVA, con comparación de pares por Tukey, con un 95% de confianza ($p<0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Hidrogeles con entrecruzamiento asistido por luz UV

Se elaboraron los hidrogeles bajo exposición a luz UV con el protocolo propuesto. Para evaluar la posibilidad de aplicar la fotoxidación y el ácido succínico para favorecer el entrecruzamiento de los hidrogeles, se obtuvo espectros FTIR de los materiales y se realizó hinchamiento. Adicionalmente, se empleó el ácido acético bajo la misma metodología con el fin de poder comparar los resultados, puesto que este ácido es ampliamente utilizado en otras investigaciones [28]–[30] para la formación de compuestos polielectrolíticos (PEC por sus siglas en inglés).

3.1.1. Estructura química

Se pudo distinguir una diferencia física, macroscópica, en la elaboración de los hidrogeles relacionada a los ácidos utilizados. El uso del ácido succínico resultó en la formación de una especie de membrana que pudo ser fácilmente separada del sobrenadante como se puede ver en la Figura 1-a. Mientras que con el ácido acético se producen pequeños agregados dispersos en la solución (Figura 1-b), típico de este método [28], por lo que es necesario centrifugar para obtener el hidrogel. A modo de determinar si estas propiedades son resultado de un cambio en la estructura química y cualquier otro cambio, se tomaron espectros FTIR de los materiales bases y de los hidrogeles.

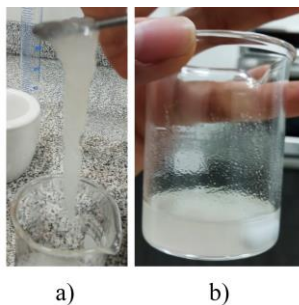


Figura 1. Apariencia de los hidrogeles formados, a) con ácido succínico (HAS/HASUV) y b) con ácido acético (HAA/HAAUV)

En la Figura 2 se muestran espectros FTIR de la pectina, el quitosano y la mezcla física de los dos polímeros sin el tratamiento, en el rango $900\text{-}1900\text{ cm}^{-1}$ dónde se encuentran los picos de interés. En esta se puede ver las bandas características de los polímeros, en el caso de la pectina, se observa la banda del grupo carbonilo (C=O) de los grupos carboximetil ($-\text{COOCH}_3$) [3], [13] y del ácido carboxílico sin disociar ($-\text{COOH}$) en 1740 cm^{-1} [31]. Mientras que alrededor de 1622 cm^{-1} se tiene la banda que se asocia al grupo carboxilato ($-\text{COO}^-$) [31].

Por otra parte, los picos característicos que se pueden encontrar en el espectro del quitosano son los correspondientes a los grupos amida. Así, en la Figura 2-b se observa alrededor de 1652 cm^{-1} un pequeño pico del grupo carbonilo de la amida I y en 1594 cm^{-1} la flexión del grupo amino (N-H) de la amida II [32]. Estos picos, así como los provenientes de la pectina también se encuentran en la mezcla física sin tratamiento de pectina y quitosano a una proporción 1:1 (Figura 2-c), alrededor de las mismas bandas. La banda del grupo carbonilo de la pectina puede estar solapada por las bandas de las amidas I y II del quitosano.

Las bandas descritas son las que podrían experimentar un cambio por la interacción entre los polímeros. En la Figura 3 se tienen los espectros de los hidrogeles comparados con la mezcla física de la pectina y el quitosano (Pc:Qt). En los espectros de los hidrogeles HAS, HAA y HAAUV se puede observar una banda alrededor de 1526 cm^{-1} que se atribuye a la interacción iónica entre los grupos $-\text{COO}^-$ de la pectina y NH_3^+ del quitosano [28], y una en

1600 cm^{-1} que se puede asignar a la combinación de los enlaces N-H y C=O [16], [28]. Sin embargo, se puede ver que en el caso de los hidrogeles con ácido succínico la primera banda mencionada no tiene un pico prominente como los hidrogeles con ácido acético, si no que abarca un dominio más amplio (1526-1548 cm^{-1}), que podría ser resultado de una mayor interacción iónica por la presencia de los dos grupos carboxílatos del ácido succínico que absorben comúnmente alrededor de 1560 cm^{-1} [25].

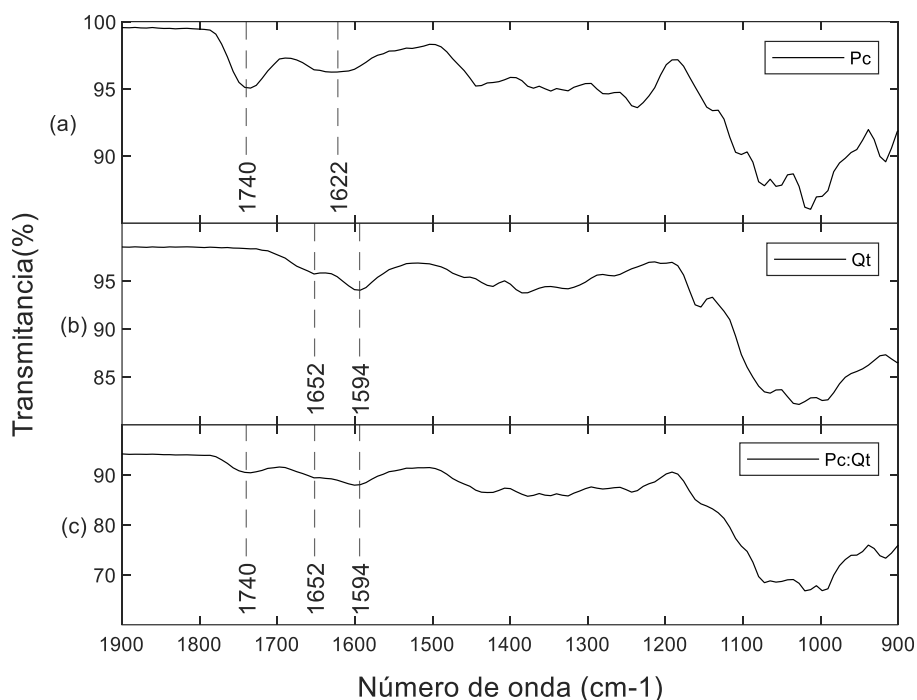


Figura 2. Espectros FTIR de los materiales base de los hidrogeles. a) Pectina, b) quitosano y c) mezcla física de pectina y quitosano sin tratamiento.

Por otro lado, en el caso del hidrogel HASUV se tiene un pico en 1593 cm^{-1} en lugar de 1600 cm^{-1} , que podría indicar el efecto de la radiación con luz UV. Según lo obtenido por Chen et al [29] mientras más fuerte la interacción iónica la banda comúnmente ubicada alrededor 1600 cm^{-1} , designada a la interacción iónica, se desplaza a números de onda más bajos. De manera que la luz UV podría haber aumentado el grado de entrecruzamiento para los hidrogeles con ácido succínico.

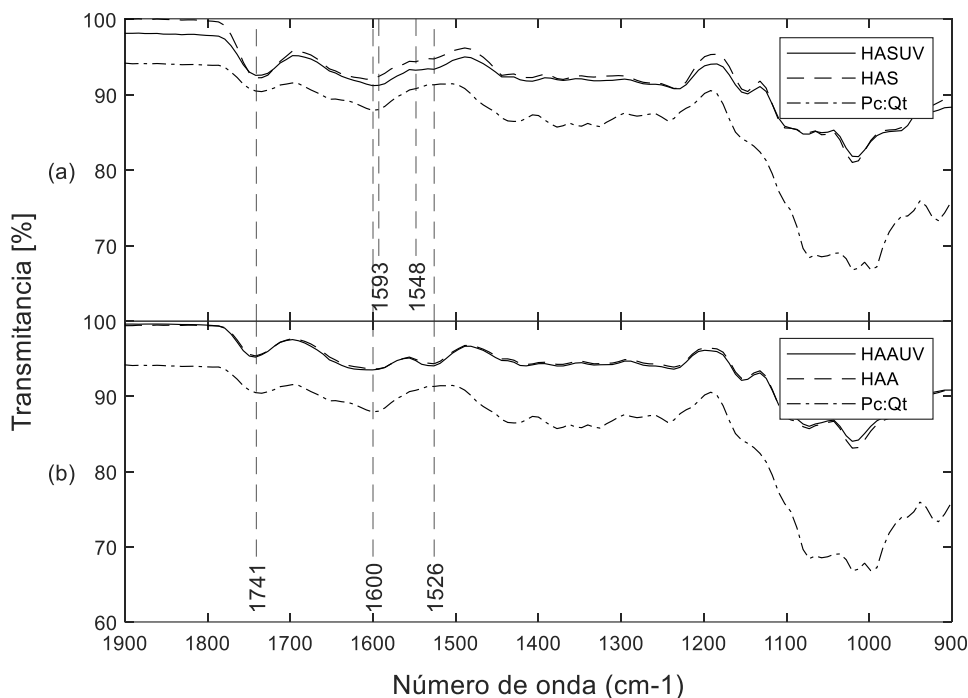


Figura 3. Espectros FTIR de los hidrogeles con exposición UV comparados con la mezcla de pectina y quitosano sin tratamiento. a) Hidrogeles realizados con ácido succínico con (HASUV) y sin luz UV (HAS), y b) hidrogeles realizados con ácido acético con (HAAUV) y sin luz UV (HAA)

3.1.2. Estabilidad de los hidrogeles

El hinchamiento de los hidrogeles se realizó con el objetivo de analizar su estabilidad en condiciones que asemejan las fisiológicas. Para esto se utilizaron los xerogeles de ácido succínico y acético con tratamiento UV, así como sin tratamiento UV como control (Figura 4). Por medio del análisis ANOVA con un nivel de confianza del 95% se obtuvo que la aplicación de luz UV, el tipo de ácido, la interacción ácido-tiempo y la interacción luz UV-ácido tienen un efecto significativo en el grado de hinchamiento de los hidrogeles ($p < 0.05$).

En el caso del tiempo, por medio de la prueba de Tukey con el mismo nivel de confianza (95%) se determinó que no hay una diferencia significativa del grado de hinchamiento a los diferentes tiempos. Es decir que los hidrogeles, de todas las composiciones, se hinchan en la primera hora y llegan al equilibrio, en el que se mantienen por las 72 h que duró este estudio. Por otra parte, según el tipo de ácido se obtuvo que los hidrogeles de ácido succínico tanto con

y sin UV tienen un mayor grado de hinchamiento en comparación a los de ácido acético como se puede ver en la Figura 4. Adicionalmente, sin bien la luz UV tiene un efecto significativo, este es solamente el caso de los hidrogeles hechos con ácido succínico, resultando en un menor grado de hinchamiento al aplicar luz UV.

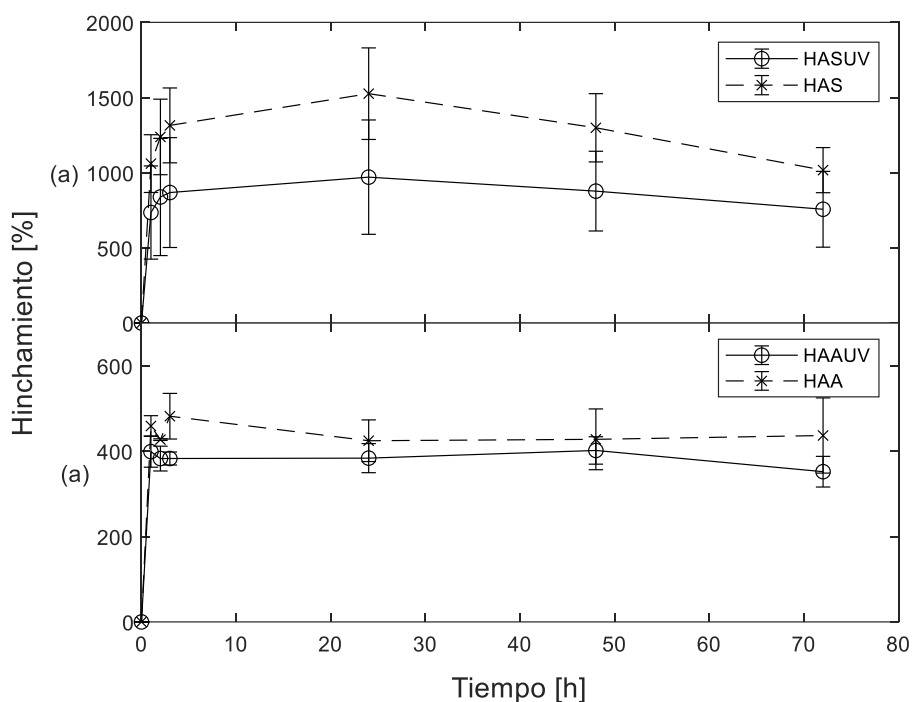


Figura 4. Cinética de hinchamiento para los xerogeles con y sin tratamiento UV, a) con ácido succínico: HASUV y HAS, y b) con ácido acético: HAAUV y HAA

El ácido succínico al tener dos grupos carboxílicos y una estructura de carbono más larga es capaz de interactuar en mayor grado con los grupos amino del quitosano, proporcionando protones para disolver el polímero [19]. Esto a su vez puede permitir un mayor contacto con la pectina, formando estructuras más grandes, lo que se pudo observar durante la formación de los hidrogeles. A su vez, aumentando la cantidad de pectina en el hidrogel la cual a un pH 7.4 se desprotona cargándose negativamente e incrementando la repulsión electrostática aumentando el espacio entre las cadenas de polímeros y favoreciendo el hinchamiento [3], [28]. Además, en estructuras más grandes hay un aumento en los grupos

hidrofílicos que ayudan a la difusión del agua hacia el hidrogel, también asistiendo en el hinchamiento [28].

El menor grado de hinchamiento obtenido en los hidrogeles de ácido succínico con exposición a la luz UV corrobora que se obtuvo un mayor entrecruzamiento al aplicar la luz UV, formando estructuras más densamente conectadas reduciendo el espacio entre las cadenas por lo que el hinchamiento es menor. No obstante, el entrecruzamiento sigue siendo de carácter iónico.

Finalmente, durante el hinchamiento se pudo observar la degradación de los hidrogeles, a mayor grado en los realizados con ácido succínico. Según lo propuesto, esto podría ser el resultado del mayor contenido de pectina, la cual al ser soluble en agua podría propiciar la desintegración de la estructura.

3.2. Hidrogeles entrecruzados con succinato de dimetilo (SD)

Al no visualizar variaciones en la estructura química por la exposición a la luz UV, se realizó un cambio en el protocolo, manteniendo el ácido succínico para el entrecruzamiento. Sin embargo, se modificó sus grupos funcionales mediante una esterificación para obtener succinato de dimetilo. Con lo cual se obtuvo hidrogeles más firmes que se forman con todo el polímero disponible y que toman la forma de su contenedor, como se puede ver en la Figura 5.



Figura 5. Hidrogeles formados con SD como agente entrecruzante (Pc:Qt(1:1)/2.3)

3.2.1. Estructura química

De esta manera, el efecto del SD se pudo notar en primera instancia macroscópicamente durante la elaboración del hidrogel y después se tomaron los espectros FTIR para comprobar su impacto en la estructura química. En la Figura 6 se presentan los espectros de los hidrogeles a sus diferentes composiciones, en los que se puede observar un desplazamiento del pico en 1593 cm^{-1} de la amida II de la mezcla Pc:Qt (Figura 2) a 1585 cm^{-1} para los hidrogeles Pc.Qt(1:1)/1.6 y Pc.Qt(1:1)/1.8, a 1570 cm^{-1} para Pc.Qt(1:1)/2.0 y Pc.Qt(1:1)/2.3, y a 1563 cm^{-1} para Pc.Qt(2:1)/2.0, Pc.Qt(2:1)/2.3 y todos los hidrogeles con mayor cantidad de quitosano (1:2). Mientras que para los hidrogeles con mayor contenido de pectina y menor cantidad de SD (Pc.Qt(2:1)/1.6, Pc.Qt(2:1)/1.8) se mantiene en 1593 cm^{-1} . Además, para todos los hidrogeles surge una banda adicional alrededor de 1548 cm^{-1} .

También se observa un desplazamiento de la banda del grupo carbonilo de 1741 cm^{-1} a 1727 cm^{-1} para el hidrogel Pc.Qt(1:1)/2.3 y a 1734 cm^{-1} para todo los hidrogeles de proporción 1:2 y los de 2:1 con 2 y 2.3% de SD. En tanto que, la banda permanece en 1741 cm^{-1} en los hidrogeles con mayor e igual contenido de pectina (2:1 y 1:1), y menor porcentaje de SD (1.6 y 1.8%).

El desplazamiento de las bandas en 1593 cm^{-1} a números de onda más bajo (1585 , 1570 y 1563 cm^{-1}) en los diferentes hidrogeles podría señalar la formación de un enlace amida y a su vez un indicador del grado de entrecruzamiento. Lo que sugiere que el grado de entrecruzamiento químico aumenta con el contenido de quitosano y de éster. Por otro lado, la banda en 1548 cm^{-1} indica que también parece haber un entrecruzamiento iónico, como en los hidrogeles de ácido succínico con UV. El cual podría ser predominante en los hidrogeles con mayor contenido de pectina y menor porcentaje de SD, razón por la que se presentan las bandas en 1593 cm^{-1} y 1741 cm^{-1} parecido a los hidrogeles con ácido succínico (Figura 3).

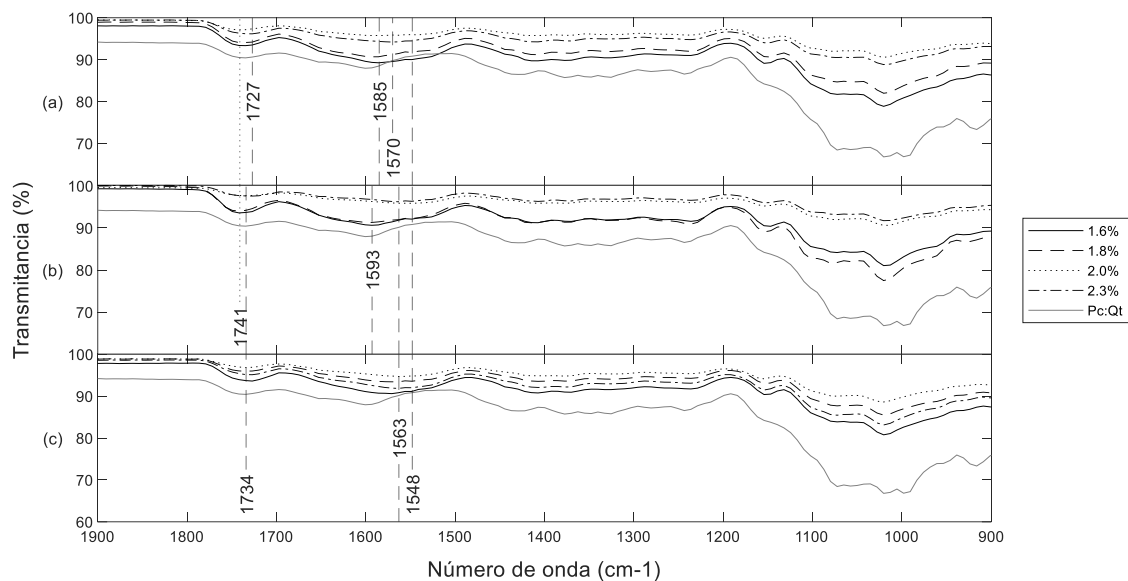
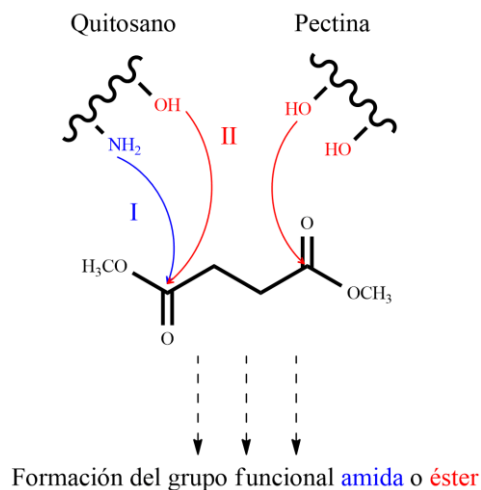


Figura 6. Espectros de los hidrogel hechos con diferentes concentraciones de succinato de dimetilo, especificadas en la leyenda, y diferentes proporciones de pectina-quitosano: a) 1:1, b) 2:1 y c) 1:2

Para obtener un mejor entendimiento del efecto del succinato de dimetilo en el entrecruzamiento se realizaron una serie de controles siguiendo la misma metodología. En primer lugar, se analizó la pectina y el quitosano por separado. Ya que el succinato de dimetilo puede actuar sobre los grupos $-OH$ y $-NH_2$ de los polímeros, para formar los enlaces éster y amida, respectivamente (Esquema 1). Después, de la misma manera, se utilizó soluciones de alginato-quitosano y almidón-quitosano. El alginato (Ag), al tener la estructura parecida a la pectina, pero sin grupos carboximetil que puedan solapar los grupos éster formados por el entrecruzamiento, permitiría comprobar la formación de enlaces éster. No obstante, también podría ocurrir un solapamiento por la protonación de los carboxilatos, por lo que se utiliza el almidón (Al) con el mismo fin.



Esquema 1. Mecanismo de reacción entre el succinato de dimetilo y los grupos funcionales del quitosano y la pectina

En la Figura 7 se puede ver los espectros de todos los polímeros antes y después de aplicar el éster. Para la pectina (Figura 7-a) no se obtuvo cambio significativo en la banda de los ésteres (1741 cm^{-1}) [33], descartando la posibilidad de la formación del éster para el entrecruzamiento. Lo cual se puede confirmar con el almidón (Figura 7-d), al no presentar diferencia después de añadir el SD. Y de la misma manera con el alginato (Figura 7-c), ya que, pese a la presencia de un pico en 1727 cm^{-1} , este se puede atribuir a la protonación de grupos carboxilatos [34] debido a una reducción del pH al añadir el SD. Puesto que este crecimiento está acompañado de una reducción en la intensidad de la banda en 1593 cm^{-1} del grupo carboxilato. Sin embargo, en la pectina también se puede observar un cambio importante alrededor de 1600 cm^{-1} que podría indicar la hidrólisis del succinato de dimetilo por lo que aumentan los grupos carboxilato.

Por el contrario, en el caso del quitosano (Figura 7-b) al añadir el SD surge un pico en 1727 cm^{-1} y existe un desplazamiento de la banda de 1593 cm^{-1} a 1556 cm^{-1} , sugiriendo la formación de un enlace amida (1556 cm^{-1}) [29] por medio del mecanismo I así como la formación de un grupo éster (1727 cm^{-1}) [35], [36] según el mecanismo II (Esquema 1). La formación de la amida puede catalizar la formación del éster, produciendo el entrecruzamiento

por estos dos grupos. Esto apoya el planteamiento de un mayor entrecruzamiento con el aumento de la cantidad de quitosano. Es importante mencionar que, bajo las condiciones trabajadas no hubo la formación de hidrogeles solamente de quitosano.

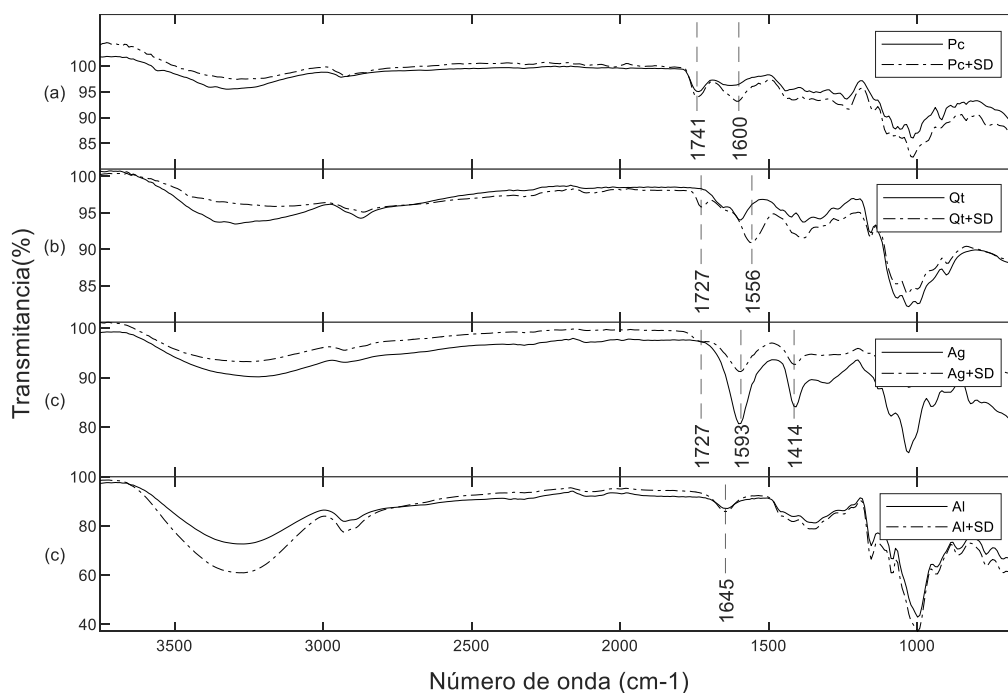


Figura 7. Espectros FTIR de los diferentes polímeros antes y después de aplicar la metodología con SD

Así, los picos en 1720 cm^{-1} de las mezclas tratadas de quitosano-alginato y quitosano-almidón (Figura 8), podrían estar relacionadas solamente a la reacción del éster con el quitosano. Además, esta misma banda es apenas perceptible en los compuestos de quitosano-alginato con SD y no se puede diferenciar la banda del quitosano en 1556 cm^{-1} , a lo contrario que en los compuestos de quitosano-almidón donde las bandas del quitosano con SD se distinguen fácilmente. Esto puede ser el resultado de una interacción más fuerte entre el quitosano y el alginato que no permite que el SD actúe sobre el quitosano, ya que estos dos polímeros también pueden tener un entrecruzamiento iónico. De manera que para el entrecruzamiento con SD, el quitosano requiere de la presencia de la pectina para formar los hidrogeles.

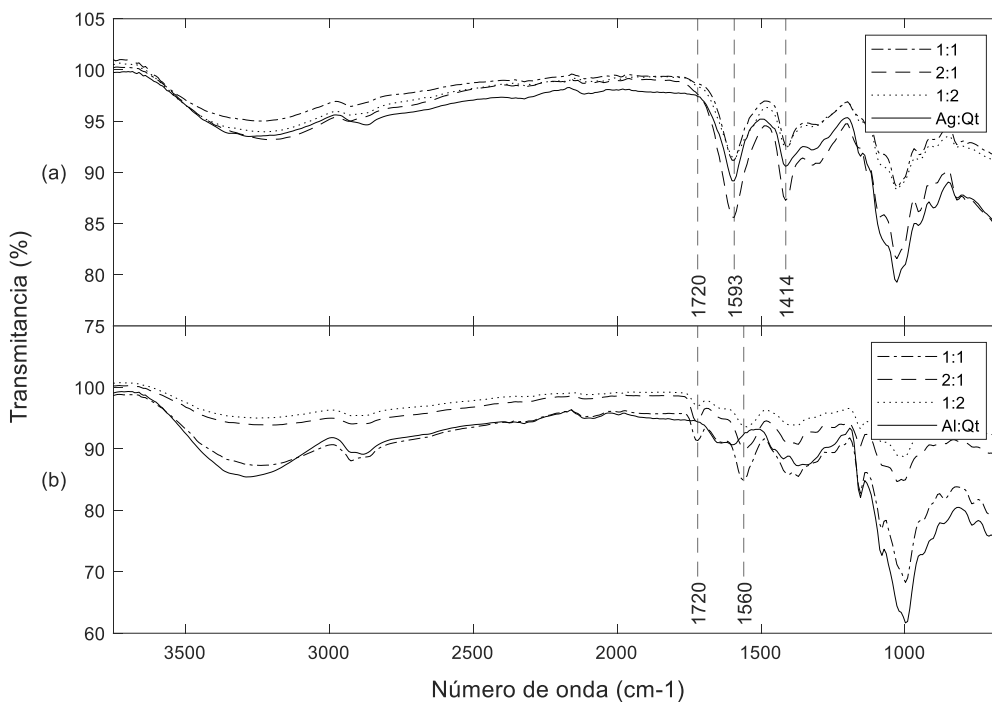


Figura 8. Espectros de las mezclas de a) quitosano-alginato y b) quitosano-almidón, a diferentes composiciones antes y después de aplicar la metodología con SD.

3.2.2. Estabilidad de los hidrogeles

Para estos hidrogeles se determinó que el tiempo, el porcentaje de SD, la composición, las interacciones tiempo-%SD, tiempo-composición y %SD-composición tienen un efecto significativo en el grado de hinchamiento. A partir de la segunda hora, no hubo una diferencia significativa en el grado de hinchamiento alcanzando un equilibrio hasta las 48 h después de lo cual disminuye. Además, el hinchamiento a las 24 h es significativamente mayor al obtenido a la 1h y a las 72 h.

Por otro lado, para cualquier porcentaje de ácido, los hidrogeles con mayor contenido de pectina (2:1) son los que tienen un mayor grado de hinchamiento, seguidos por los de proporción equivalente (1:1), mientras que los de mayor contenido de quitosano (1:2) presentan el menor grado. Además, no existe una diferencia significativa entre los geles con menor porcentaje de SD (1.6 y 1.8%) y tampoco entre los de mayor porcentaje (2 y 2.3%). Sin

embargo, los de menor porcentaje alcanzan un mayor grado de hinchamiento en comparación a los de mayor concentración de SD.

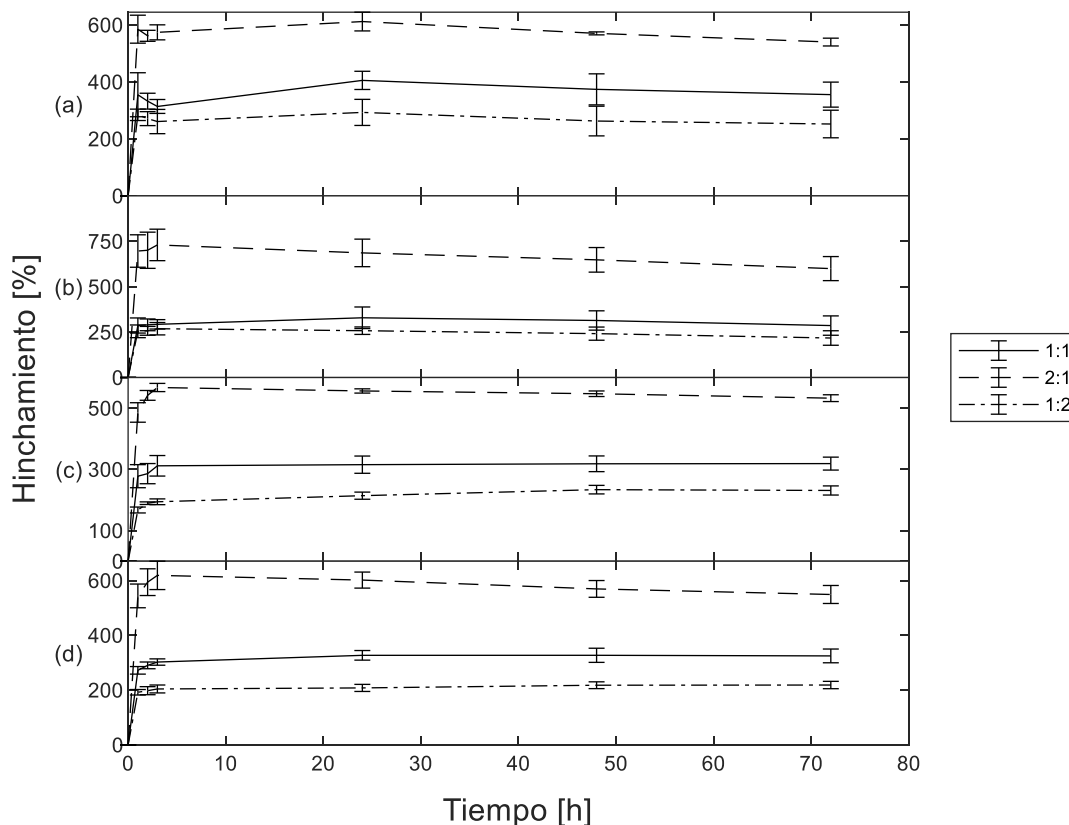


Figura 9. Grado de hinchamiento de los hidrogel a diferentes composiciones, especificadas en la leyenda, y concentraciones de SD. a) 1.6%, b) 1.8%, c) 2% y d) 2.3%

De manera específica, el hidrogel Pc.Qt(2:1)/1.8 es el que tiene el mayor grado de hinchamiento, y los hidrogel Pc.Qt(1:2)/2.0 y Pc.Qt(1:2)/2.3 tienen el menor. Esto indica que, a mayor contenido de quitosano y mayor concentración de SD, menor el grado de hinchamiento. Esto se puede relacionar con el mayor entrecruzamiento para los hidrogel con mayor contenido de quitosano y SD planteado en el análisis FTIR, puesto que con el aumento de la densidad de entrecruzamiento, el espacio intermolecular se reduce, limitando la capacidad de absorber agua [29], [30]. En contraste, el mayor contenido de pectina favorece el hinchamiento, concordando con los resultados obtenidos en otros estudios [37], [38].

3.2.3. Morfología de los hidrogeles

La morfología de los hidrogeles se estudió mediante las micrografías electrónicas de barrido que se presentan en la Figura 10. Los hidrogeles presentan una estructura irregular y porosa. En los hidrogeles de composición 1:1, existe la formación de filamentos en la superficie que parecieran cubrir la estructura porosa, los cuales parecen acumularse y formar láminas más extensas a medida que se aumenta la cantidad de SD. Razón por la que no se visualizan poros en esta sección del hidrogel Pc.Qt(1:1)/2.3. En cambio, en los hidrogeles con más alto contenido de pectina, los poros son más visibles (flecha roja, Figura 10), presentando una configuración menos filamentosa en los hidrogeles con menor porcentaje de SD. Sin embargo, al aumentar el %SD, se tiene el mismo comportamiento que en el hidrogel Pc.Qt(1:1)/2.3, al visualizarse la superficie como de una película con pocos poros en la superficie, pero con menor rugosidad. Por otra parte, los hidrogeles Pc.Qt(1:2)/1.6 presentan poros más pequeños (flecha azul, Figura 10) en comparación a los de la misma concentración de SD pero diferente composición. Y se vuelve a ver la estructura desordenada y cubierta de filamentos, con una característica adicional, ya que se tiene la presencia de agregados, fracciones más densas y compactas. Los cuales abarcan mayor parte de la estructura mientras se aumenta el %SD.

Por tanto, es evidente que tanto la composición como el porcentaje de succinato de dimetil tienen un efecto en la microestructura de los hidrogeles. El alto contenido de pectina propicia la formación de estructuras con mayor homogeneidad y poros más grandes, lo cual favorece el ingreso del agua al hidrogel [37] para así obtener un alto grado de hinchamiento. En el caso de los hidrogeles con más quitosano, si bien es una estructura porosa, el mayor grado de entrecruzamiento podría causar rigidez y la aglomeración de material (círculo rojo, Figura 10) restringiendo la capacidad de extender la estructura e hincharse, logrando así el menor grado de hinchamiento para estos hidrogeles.

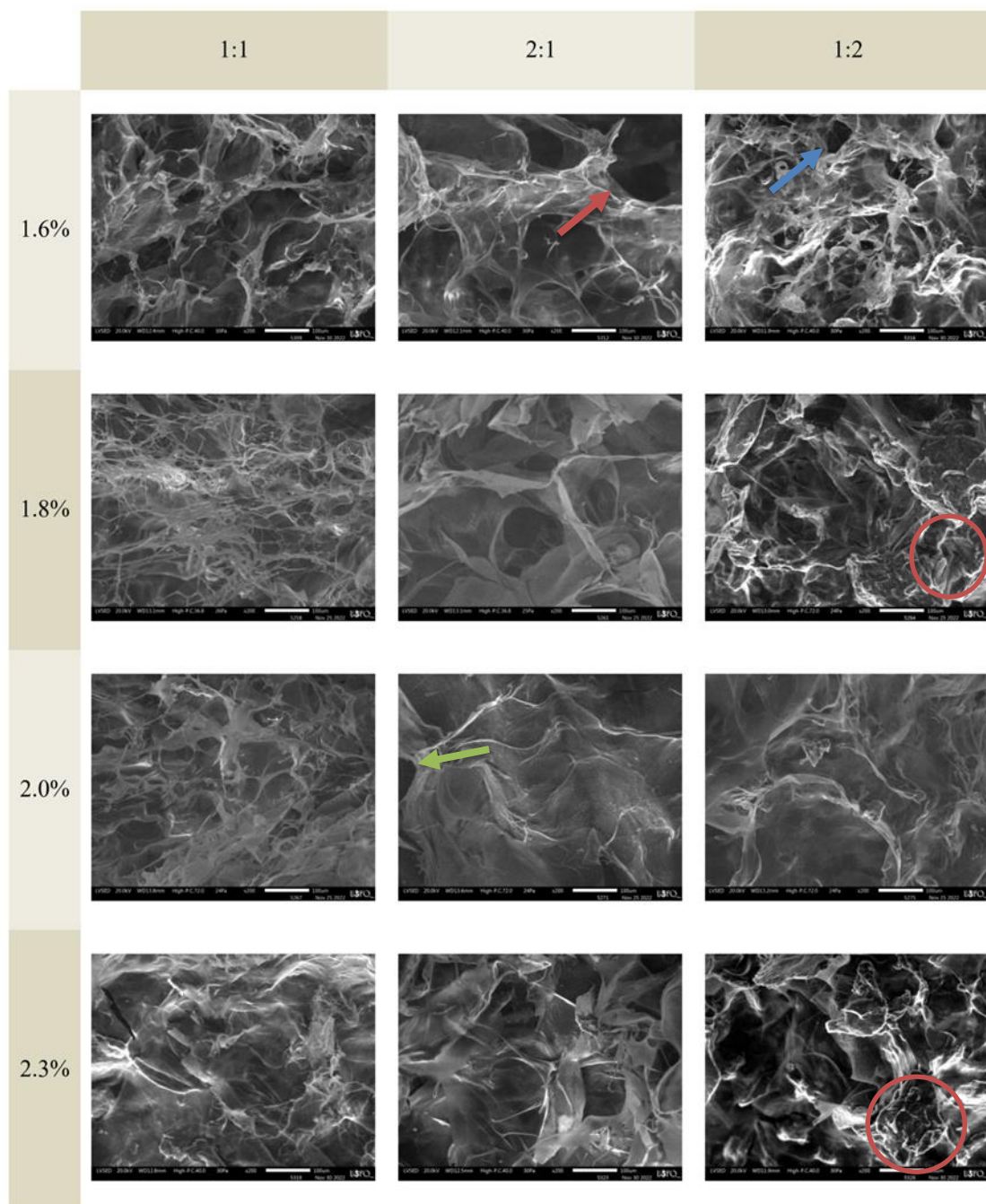


Figura 10. Micrografías electrónicas de barrido para las diferentes formulaciones de hidrogeles. En la primera columna se indica la concentración de SD (1.6-2.3%) y en la primera fila, la proporción pectina-quitosano (1:1, 2:1 y 1:2). Barra de calibración: 100 μm .

3.2.4. Encapsulación y liberación de acetaminofén

Para realizar la liberación del fármaco se escogió entre los hidrogeles con menor grado de hinchamiento. Puesto que entre 2% y 2.3% no hay diferencias significativas, se escogió al 2% de SD y a las tres composiciones, al haber diferencias entre estas. Sin embargo, a pesar de

esta diferencia en el hinchamiento, se obtuvo que el porcentaje de liberación no es estadísticamente diferente sin importar la composición de los polímeros. Y solamente el tiempo tiene un efecto significativo.

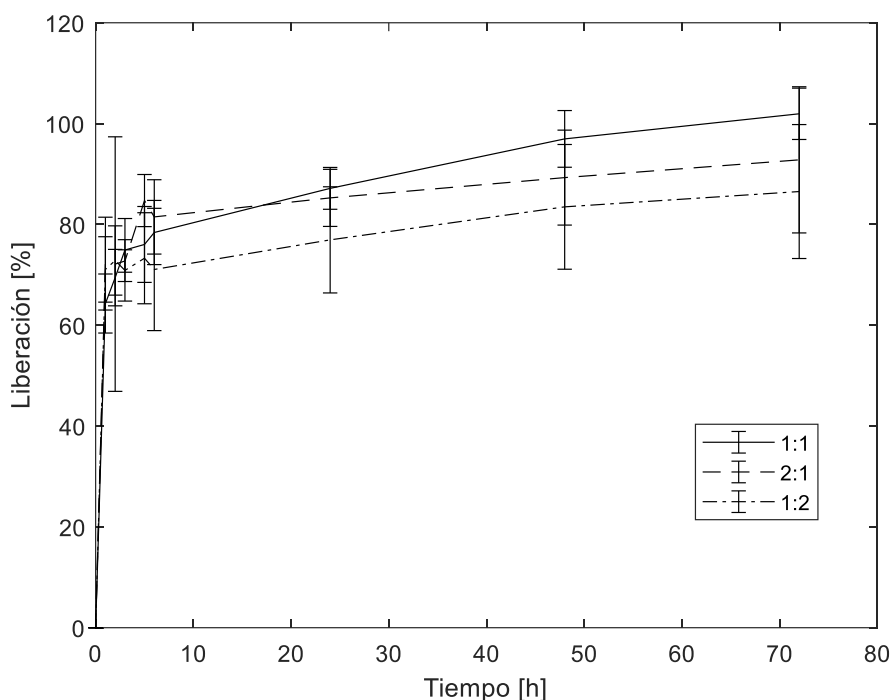


Figura 11. Liberación acumulativa para los hidrogel al 2% de SD, a diferentes composiciones especificadas en la leyenda

Así, se obtuvo que a partir de las 5 h no hay diferencia estadísticamente significativa hasta las 48 h. Tras lo cual se pudo alcanzar la mayor liberación a las 72 h. En cambio, durante las tres primeras horas se tuvo el menor porcentaje de liberación. Adicionalmente, se obtuvo una liberación superior al 60% y en algunos casos hasta el 100%; esto podría ser el resultado de la absorbancia de algún componente del hidrogel.

La liberación del fármaco depende de la interacción de este con los polímeros, así como la estructura del hidrogel. El paracetamol tiene grupos amida e hidroxilos que pueden interactuar con los grupos amina e hidroxilo de los polímeros, reduciendo la velocidad de liberación [39]. Según los resultados obtenidos no se pudo determinar una posible interacción. Por lo que la similitud en la liberación se podría atribuir al parecido en la morfología de los

hidrogeles (Figura 10) en los que se ve la formación de un tipo de lámina en la superficie y la disminución de poros.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los hidrogeles formados con ácido succínico alcanzan un mayor porcentaje de hinchamiento en comparación a los realizados con ácido acético, lo cual se debe a que sus dos grupos carboxílicos pueden aumentar la interacción entre los polímeros, formando estructuras más grandes. De manera que, el ácido succínico puede actuar como un agente entrecruzante iónico. Por otra parte, la irradiación con luz UV a los polímeros en presencia de ácido succínico aumenta el grado de entrecruzamiento, a su vez reduciendo el grado de hinchamiento en comparación a los hidrogeles sin exposición a luz UV. Lo que no sucede con el ácido acético, por lo que el efecto de la luz UV podría estar relacionado con el grado de interacción entre el ácido succínico y el quitosano.

De la misma manera, el éster de ácido succínico, el succinato de dimetilo demostró su capacidad de formar un entrecruzamiento covalente entre la pectina y el quitosano. Mostrando particular afinidad con el quitosano al formar tanto enlaces amida como éster con este biopolímero. Esta afinidad hacia el quitosano, resultó en un aumento en el grado de entrecruzamiento a medida que se aumenta la cantidad de quitosano y de éster. Esto afecta al hinchamiento y a la morfología de los hidrogeles. Siendo los hidrogeles con la mayor cantidad de quitosano (1:2) y de SD (2, 2.3%) los que presentan menor grado de hinchamiento, y una microestructura menos porosa y más compacta. De modo que, las propiedades de los hidrogeles se podrían ajustar de acuerdo a su aplicación por medio de la proporción de los polímeros y la concentración de SD.

De acuerdo a lo obtenido, para obtener una mayor claridad del efecto del ácido succínico y la radiación con luz UV en la formación de complejos polielectrolíticos de pectina-quitosano, se recomienda ampliar el estudio al aumentar las variables como la composición de

los polímeros y el tiempo de exposición, además de realizar más análisis como el de SEM. Mientras, que en el caso de los hidrogeles realizados con SD, se sugiere realizar el estudio de liberación en las formulaciones con mayor hinchamiento para conocer el efecto de la cantidad de SD aplicada. Además, se podría investigar si se puede dar la formación del hidrogel al añadir el SD a uno de los polímeros por separado y después mezclar las soluciones, ya que la gelificación es inmediata esto permitiría formar filamentos por medio de la extrusión del hidrogel.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] W. Wang, R. Narain, and H. Zeng, “Hydrogels,” in *Polymer Science and Nanotechnology: Fundamentals and Applications*, Elsevier, 2020, pp. 203–244. doi: 10.1016/B978-0-12-816806-6.00010-8.
- [2] N. A. Peppas, B. v. Slaughter, and M. A. Kanelberger, “Hydrogels,” in *Polymer Science: A Comprehensive Reference, 10 Volume Set*, vol. 9, Elsevier, 2012, pp. 385–395. doi: 10.1016/B978-0-444-53349-4.00226-0.
- [3] L. Neufeld and H. Bianco-Peled, “Pectin–chitosan physical hydrogels as potential drug delivery vehicles,” *Int J Biol Macromol*, vol. 101, pp. 852–861, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.167.
- [4] J. Li, D. J. Mooney, and J. A. Paulson, “Designing hydrogels for controlled drug delivery,” vol. 1, no. 12, 2016, doi: 10.1038/natrevmats.2016.71.
- [5] A. Manzoor *et al.*, “Recent insights into polysaccharide-based hydrogels and their potential applications in food sector: A review,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 213. Elsevier B.V., pp. 987–1006, Jul. 31, 2022. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.06.044.
- [6] N. Kalai Selvan, T. S. Shanmugarajan, and V. N. V. A. Uppuluri, “Hydrogel based scaffolding polymeric biomaterials: Approaches towards skin tissue regeneration,” *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 55. Editions de Sante, Feb. 01, 2020. doi: 10.1016/j.jddst.2019.101456.
- [7] E. M. Ahmed, “Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review,” *Journal of Advanced Research*, vol. 6, no. 2. Elsevier B.V., pp. 105–121, 2015. doi: 10.1016/j.jare.2013.07.006.
- [8] M. Ortiz-Sanchez, J. C. Solarte-Toro, C. E. Orrego-Alzate, C. D. Acosta-Medina, and C. A. Cardona-Alzate, “Integral use of orange peel waste through the biorefinery

- concept: an experimental, technical, energy, and economic assessment,” *Biomass Convers Biorefin*, vol. 11, no. 2, pp. 645–659, Apr. 2021, doi: 10.1007/s13399-020-00627-y.
- [9] S. Groult, S. Buwalda, and T. Budtova, “Pectin hydrogels, aerogels, cryogels and xerogels: Influence of drying on structural and release properties,” *Eur Polym J*, vol. 149, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2021.110386.
- [10] W. Zhao, X. Jin, Y. Cong, Y. Liu, and J. Fu, “Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering,” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 88, no. 3, pp. 327–339, Mar. 2013. doi: 10.1002/jctb.3970.
- [11] T. K. Giri, A. Thakur, A. Alexander, Ajazuddin, H. Badwaik, and D. K. Tripathi, “Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: Present status and applications,” *Acta Pharmaceutica Sinica B*, vol. 2, no. 5. Chinese Academy of Medical Sciences, pp. 439–449, 2012. doi: 10.1016/j.apsb.2012.07.004.
- [12] S. M. Samani, F. Ahmadi, Z. Oveisi, and Z. Amoozgar, “Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications,” 2015.
- [13] R. K. Mishra, M. Datt, and A. K. Banthia, “Synthesis and characterization of pectin/pvp hydrogel membranes for drug delivery system,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 9, no. 2, pp. 395–403, Jun. 2008, doi: 10.1208/s12249-008-9048-6.
- [14] M. Sadeghi, “Pectin-Based Biodegradable Hydrogels with Potential Biomedical Applications as Drug Delivery Systems,” *J Biomater Nanobiotechnol*, vol. 02, no. 01, pp. 36–40, 2011, doi: 10.4236/jbnb.2011.21005.
- [15] W. Huang *et al.*, “On-Demand Dissolvable Self-Healing Hydrogel Based on Carboxymethyl Chitosan and Cellulose Nanocrystal for Deep Partial Thickness Burn Wound Healing,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 10, no. 48, pp. 41076–41088, Dec. 2018, doi: 10.1021/acsami.8b14526.

- [16] J. G. Martins, A. C. de Oliveira, P. S. Garcia, M. J. Kipper, and A. F. Martins, “Durable pectin/chitosan membranes with self-assembling, water resistance and enhanced mechanical properties,” *Carbohydr Polym*, vol. 188, pp. 136–142, May 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.01.112.
- [17] M. Taghizadeh *et al.*, “Photosensitizer-induced cross-linking: A novel approach for improvement of physicochemical and structural properties of gelatin edible films,” *Food Research International*, vol. 112, pp. 90–97, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.foodres.2018.06.010.
- [18] J. Gurke, Š. Budzák, B. M. Schmidt, D. Jacquemin, and S. Hecht, “Effiziente lichtinduzierte p K a -Modulation, gekoppelt mit basenkatalysierter Photochromie ,” *Angewandte Chemie*, vol. 130, no. 17, pp. 4888–4893, Apr. 2018, doi: 10.1002/ange.201801270.
- [19] P. H. Chen *et al.*, “Use of dicarboxylic acids to improve and diversify the material properties of porous chitosan membranes,” *J Agric Food Chem*, vol. 56, no. 19, pp. 9015–9021, Oct. 2008, doi: 10.1021/jf801081e.
- [20] S. Ishikawa, D. Matsukuma, K. Iijima, M. Iijima, S. Osawa, and H. Otsuka, “N-Hydroxysuccinimide Bifunctionalized Triblock Cross-Linker Having Hydrolysis Property for a Biodegradable and Injectable Hydrogel System,” *ACS Biomater Sci Eng*, vol. 5, no. 11, pp. 5759–5769, Nov. 2019, doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b00218.
- [21] H. T. Peng, M. D. Blostein, and P. N. Shek, “Experimental optimization of an in situ forming hydrogel for hemorrhage control,” *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. 89, no. 1, pp. 199–209, 2009, doi: 10.1002/jbm.b.31206.
- [22] A. Sionkowska, B. Kaczmarek, M. Gnatowska, and J. Kowalonek, “The influence of UV-irradiation on chitosan modified by the tannic acid addition,” *J Photochem Photobiol B*, vol. 148, pp. 333–339, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.03.028.

- [23] P. O. Bussiere, J. L. Gardette, G. Rapp, C. Masson, and S. Therias, “New insights into the mechanism of photodegradation of chitosan,” *Carbohydr Polym*, vol. 259, May 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.117715.
- [24] N. E. Valderruten, J. D. Valverde, F. Zuluaga, and E. Ruiz-Durántez, “Synthesis and characterization of chitosan hydrogels cross-linked with dicarboxylic acids,” *React Funct Polym*, vol. 84, pp. 21–28, 2014, doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2014.08.006.
- [25] F. Gabriele, A. Donnadio, M. Casciola, R. Germani, and N. Spreti, “Ionic and covalent crosslinking in chitosan-succinic acid membranes: Effect on physicochemical properties,” *Carbohydr Polym*, vol. 251, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117106.
- [26] H. J. Bart, J. Reidetschmger, and K. Schatka, “Kinetics of Esterification of Succinic Anhydride with Methanol by Homogeneous Catalysis.”
- [27] C. A. Garrido, M. Vargas, and J. F. Alvarez-Barreto, “Auto-Cross-Linking Hydrogels of Hydrogen Peroxide-Oxidized Pectin and Gelatin for Applications in Controlled Drug Delivery,” 2019, doi: 10.1155/2019/9423565.
- [28] R. F. N. Quadrado and A. R. Fajardo, “Vapor-induced polyelectrolyte complexation of chitosan/pectin: A promising strategy for the preparation of hydrogels for controlled drug delivery,” *J Mol Liq*, vol. 361, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.molliq.2022.119604.
- [29] P. H. Chen *et al.*, “Novel chitosan-pectin composite membranes with enhanced strength, hydrophilicity and controllable disintegration,” *Carbohydr Polym*, vol. 82, no. 4, pp. 1236–1242, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.06.057.
- [30] M. Dziadek *et al.*, “Newly crosslinked chitosan- and chitosan-pectin-based hydrogels with high antioxidant and potential anticancer activity,” *Carbohydr Polym*, vol. 290, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.carbpol.2022.119486.

- [31] V. B. v. Maciel, C. M. P. Yoshida, and T. T. Franco, “Chitosan/pectin polyelectrolyte complex as a pH indicator,” *Carbohydr Polym*, vol. 132, pp. 537–545, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.06.047.
- [32] H. F. G. Barbosa, D. S. Francisco, A. P. G. Ferreira, and É. T. G. Cavalheiro, “A new look towards the thermal decomposition of chitins and chitosans with different degrees of deacetylation by coupled TG-FTIR,” *Carbohydr Polym*, vol. 225, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115232.
- [33] K. Baysal, A. Z. Aroguz, Z. Adiguzel, and B. M. Baysal, “Chitosan/alginate crosslinked hydrogels: Preparation, characterization and application for cell growth purposes,” *Int J Biol Macromol*, vol. 59, pp. 342–348, 2013, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.04.073.
- [34] A. Stacey and J. Álvarez, “Elaboración de hidrogeles en base al entrecruzamiento entre pectina extraída de 3 frutas y quitosano para la liberación controlada de una proteína modelo.”
- [35] F. Cheng, B. Wang, and Y. Xia, “Synthesis and characterization of O-acetyl-chitosan acetic ester,” *Int J Polym Sci*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/4960416.
- [36] C. S. Caetano *et al.*, “Esterification of free fatty acids over chitosan with sulfonic acid groups,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 230, pp. 567–572, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.cej.2013.06.050.
- [37] B. Luppi, F. Bigucci, A. Abruzzo, G. Corace, T. Cerchiara, and V. Zecchi, “Freeze-dried chitosan/pectin nasal inserts for antipsychotic drug delivery,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 75, no. 3, pp. 381–387, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.ejpb.2010.04.013.

- [38] D. Demir, S. Ceylan, D. Göktürk, and N. Bölgen, “Extraction of pectin from albedo of lemon peels for preparation of tissue engineering scaffolds,” *Polymer Bulletin*, vol. 78, no. 4, pp. 2211–2226, Apr. 2021, doi: 10.1007/s00289-020-03208-1.
- [39] M. Pishnamazi, H. Hafizi, M. Pishnamazi, A. Marjani, S. Shirazian, and G. M. Walker, “Controlled release evaluation of paracetamol loaded amine functionalized mesoporous silica KCC1 compared to microcrystalline cellulose based tablets,” *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-020-79983-8.

ANEXOS

6.1. Espectro completo de los materiales base

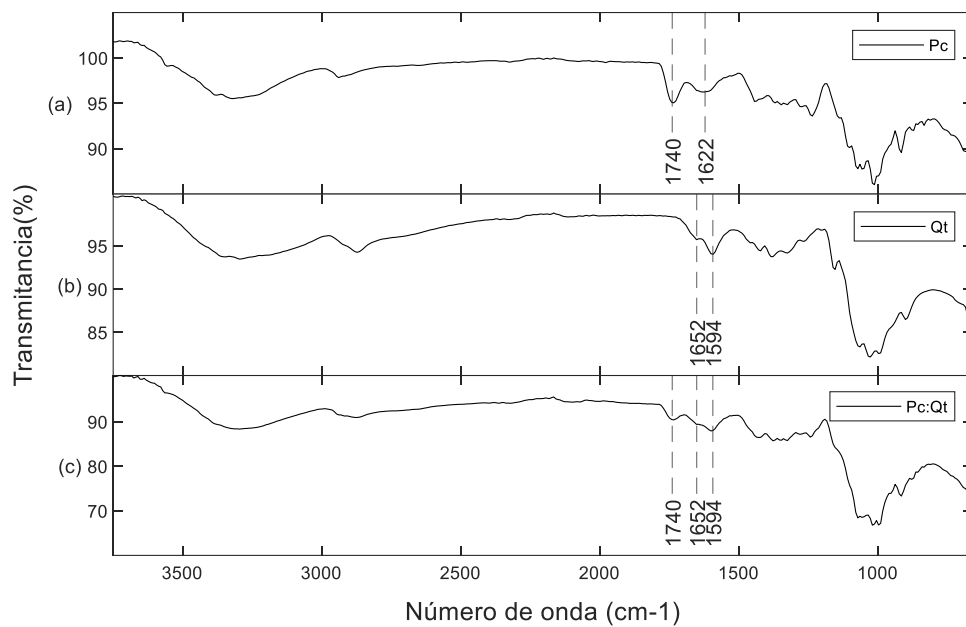


Figura 12. Espectro FTIR completo de los materiales base

6.2. Espectro del succinato de dimetilo

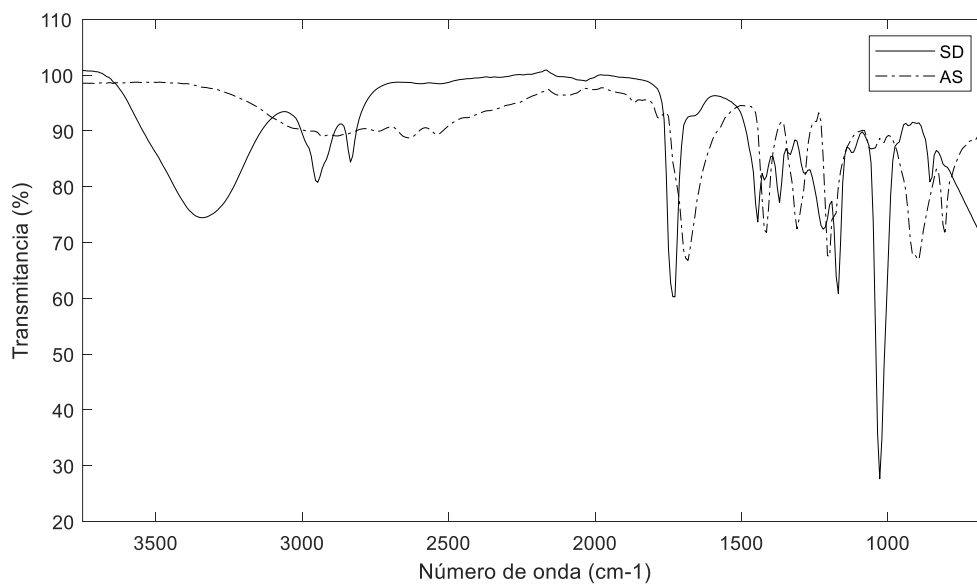


Figura 13. Espectro del ácido succínico (SA) y el succinato de dimetilo (SD)

6.3. Espectro FTIR completo de los hidrogeles con SD

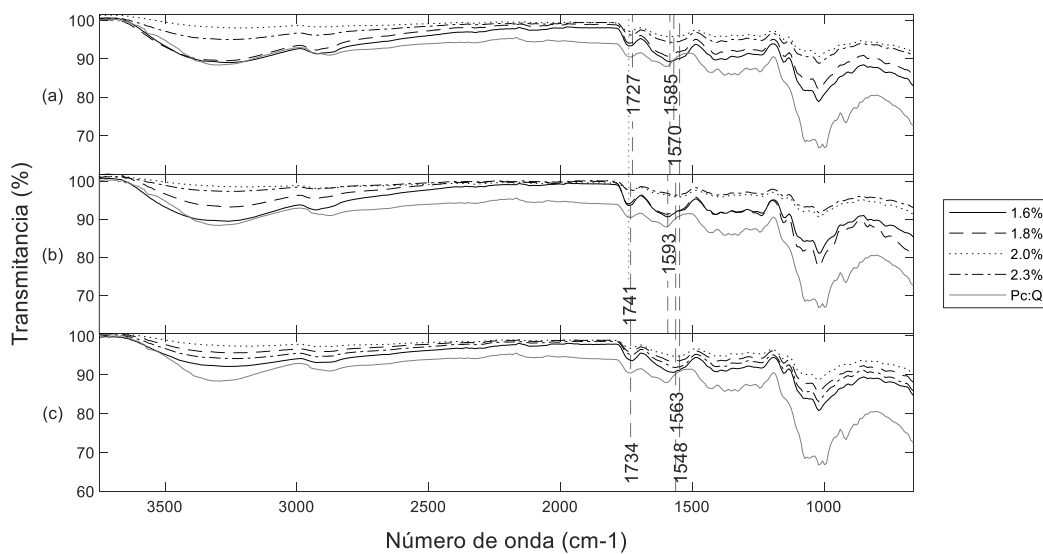


Figura 14. Espectro completo de los hidrogeles hechos con SD. a) 1:1, b) 2:1 y c) 1:2.

6.4. Curva de calibración del acetaminofén

Tabla 3. Valores para la curva de calibración del acetaminofén

Concentración [mg/mL]	Absorbancia
0.0308	1.8652
0.0250	1.5114
0.0200	1.2020
0.0150	0.8708
0.0100	0.5549
0.0050	0.2289

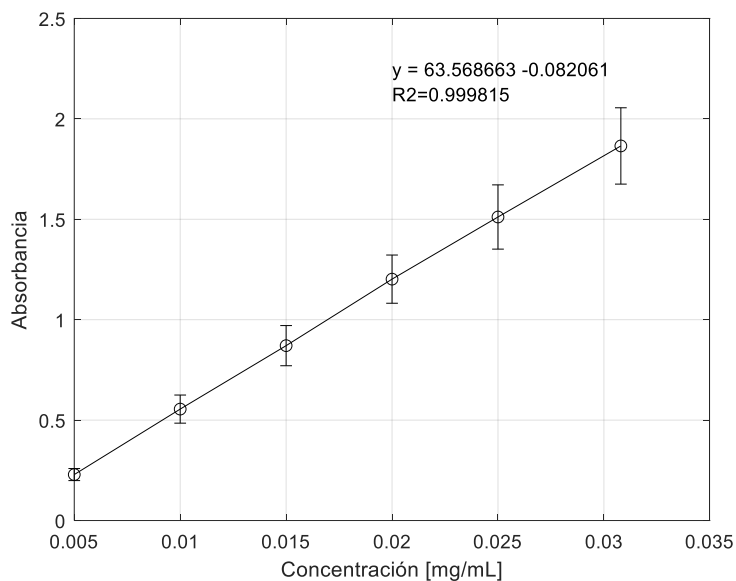


Figura 15. Curva de calibración del acetaminofén

6.5. Resultados de los análisis ANOVA y Tukey

6.5.1. Hinchamiento hidrogeles con UV

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
t (h)	6	5721552	953592	27,47	0,000
UV	1	818104	818104	23,57	0,000
Ac	1	6099082	6099082	175,71	0,000
t (h)*UV	6	170157	28359	0,82	0,561
t (h)*Ac	6	1296682	216114	6,23	0,000
UV*Ac	1	451747	451747	13,01	0,001
Error	62	2152052	34711		
Falta de ajuste	6	125052	20842	0,58	0,748
Error puro	56	2027000	36196		
Total	83	16709376			

Resumen del modelo

R-S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
186,308	87,12%	82,76% 76,36%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

<u>t (h)</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
24	12	826,094	A
3	12	761,833	A
48	12	751,424	A
2	12	721,550	A
1	12	663,400	A
72	12	640,625	A
0	12	0,000	B

Comparaciones por parejas de Tukey: UV**Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%**

<u>UV</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
W/out	42	722,249	A
W	42	524,873	B

Comparaciones por parejas de Tukey: Ac**Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%**

<u>Ac</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
Succ	42	893,020	A
Hac	42	354,102	B

Comparaciones por parejas de Tukey: t (h)*Ac**Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%**

<u>t</u>	<u>(h)*Ac</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
24	Succ	6	1248,21	A
3	Succ	6	1091,42	A
48	Succ	6	1088,22	A
2	Succ	6	1038,34	A
1	Succ	6	897,91	A
72	Succ	6	887,03	A
3	Hac	6	432,25	B
1	Hac	6	428,89	B
48	Hac	6	414,62	B
2	Hac	6	404,76	B
24	Hac	6	403,98	B

72 Hac	6	394,22	B
0 Hac	6	0,00	C
0 Succ	6	-0,00	C

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

<u>UV*Ac</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
W/out	21	1065,04	A
Succ			
W Succ	21	721,00	B
W/out	21	379,46	C
Hac			
W Hac	21	328,75	C

6.5.2. Hinchamiento de los hidrogeles con SD

Análisis de Varianza

<u>Fuente</u>	<u>GL</u>	<u>SC</u> <u>Ajust.</u>	<u>MC</u> <u>Ajust.</u>	<u>Valor</u> <u>F</u>	<u>Valor</u> <u>p</u>
t (h)	5	28919	5784	4,39	0,001
%Ac	3	130246	43415	32,98	0,000
Comp	2	5084930	2542465	1931,53	0,000
t (h)*%Ac	15	44352	2957	2,25	0,007
t (h)*Comp	10	32960	3296	2,50	0,008
%Ac*Comp	6	154118	25686	19,51	0,000
Error	174	229035	1316		
Falta de ajuste	30	13023	434	0,29	1,000
Error puro	144	216012	1500		
Total	215	5704560			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

<u>t (h)</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
24	36	400,380	A
3	36	386,541	A B
48	36	385,272	A B
2	36	376,009	A B
72	36	368,764	B
1	36	366,680	B

Comparaciones por parejas de Tukey: %Ac

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

<u>%Ac</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
1,8	54	408,630	A
1,6	54	400,167	A
2,3	54	364,308	B
2,0	54	349,327	B

Comparaciones por parejas de Tukey: Comp

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

<u>Comp</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
2:1	72	592,103	A
1:1	72	316,863	B
1:2	72	232,857	C

Comparaciones por parejas de Tukey: t (h)*%Ac

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

<u>t</u>	<u>(h)*%Ac</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
24	1,6	9	436,716	A
3	1,8	9	430,514	A B
24	1,8	9	424,204	A B C
2	1,8	9	415,869	A B C D
1	1,8	9	412,337	A B C D
1	1,6	9	408,169	A B C D
48	1,6	9	402,281	A B C D E
48	1,8	9	401,144	A B C D E
2	1,6	9	388,469	A B C D E F
3	1,6	9	382,902	A B C D E F
72	1,6	9	382,463	A B C D E F
24	2,3	9	378,779	A B C D E F
3	2,3	9	375,051	A B C D E F
48	2,3	9	371,346	B C D E F G
72	1,8	9	367,709	B C D E F G
48	2,0	9	366,315	C D E F G
72	2,3	9	364,066	C D E F G
24	2,0	9	361,822	C D E F G

72 2,0	9 360,819	D E F G
2 2,3	9 360,645	D E F G
3 2,0	9 357,695	D E F G
2 2,0	9 339,053	E F G
1 2,3	9 335,959	F G
1 2,0	9 310,258	G

Comparaciones por parejas de Tukey: t (h)*Comp

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

t	(h)*Comp	N	Media	Agrupación
3 2:1	12	622,536	A	
24 2:1	12	613,889	A	
2 2:1	12	599,526	A B	
48 2:1	12	583,634	A B	
1 2:1	12	577,772	A B	
72 2:1	12	555,262	B	
24 1:1	12	344,093	C	
48 1:1	12	333,266	C	
72 1:1	12	321,235	C	
3 1:1	12	305,153	C	
2 1:1	12	299,666	C	
1 1:1	12	297,765	C	
24 1:2	12	243,159	D	
48 1:2	12	238,915	D	
3 1:2	12	231,933	D	
72 1:2	12	229,796	D	
2 1:2	12	228,835	D	
1 1:2	12	224,505	D	

Comparaciones por parejas de Tukey: %Ac*Comp

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

%Ac*Comp	N	Media	Agrupación
1,8 2:1	18	676,726	A
2,3 2:1	18	579,421	B
1,6 2:1	18	573,824	B C
2,0 2:1	18	538,442	C
1,6 1:1	18	355,970	D
2,3 1:1	18	307,194	E
2,0 1:1	18	304,613	E
1,8 1:1	18	299,675	E

1,6 1:2	18 270,706	E F
1,8 1:2	18 249,488	F
2,3 1:2	18 206,307	G
2,0 1:2	18 204,927	G

6.5.3. Liberación de Acetaminofén

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
t (h)	7	4227,1	603,88	7,36	0,000
Comp	2	447,4	223,71	2,73	0,078
t	14	813,9	58,13	0,71	0,753
(h)*Comp					
Error	40	3283,3	82,08		
Total	63	9070,6			

Resumen del modelo

S	R- cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
9,05988	63,80%	42,99%
		0,00%

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	%L	Ajuste	Resid	Resid est.
12	54,28	72,13	-	-2,79 R
			17,85	
13	89,98	72,13	17,85	2,79 R
64	101,45	86,52	14,93	2,02 R

Residuo grande R

Comparaciones por parejas de Tukey: t (h)

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

t (h)	N	Media	Agrupación
72	8	93,7578	A

48	8 89,9114	A	B
24	8 83,1155	A	B C
5	8 78,0164	B	C
6	8 76,9823	B	C
3	8 72,8481		C
2	8 71,4745		C
1	8 69,2008		C

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Comp N Media Agrupación

2:1	16 81,3343	A
1:1	24 81,1447	A
1:2	24 75,7611	A

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

t (h)*Comp N Media Agrupación

72 1:1	3 101,944	A
48 1:1	3 96,965	A B
72 2:1	2 92,808	A B C
48 2:1	2 89,285	A B C
24 1:1	3 87,151	A B C
72 1:2	3 86,522	A B C
24 2:1	2 85,262	A B C
5 2:1	2 84,734	A B C
48 1:2	3 83,484	A B C
6 2:1	2 81,490	A B C
6 1:1	3 78,395	A B C
24 1:2	3 76,934	A B C
5 1:1	3 76,025	A B C
3 1:1	3 74,922	A B C
5 1:2	3 73,291	A B C
2 1:2	3 72,844	B C
3 2:1	2 72,740	A B C
1 2:1	2 72,224	A B C
2 2:1	2 72,132	A B C
1 1:2	3 71,070	B C
6 1:2	3 71,062	B C
3 1:2	3 70,882	B C
2 1:1	3 69,448	B C
1 1:1	3 64,308	C