

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

## **Colegio de Ciencias e Ingenierías**

Estudio de estabilidad de hidrogeles formados a partir de quitosano funcionalizado con cianoguanidina y almidón de yuca oxidado.

**Denise Micaela Costales Dillon**

**Ingeniería Química**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniería 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**

Estudio de estabilidad de hidrogeles formados a partir de quitosano funcionalizado con cianoguanidina y almidón de yuca oxidado.

**Denise Micaela Costales Dillon**

**José Ramón Mora, Ph.D**

**José Francisco Álvarez Barreto, Ph.D**

Quito, 19 de diciembre de 2022

## © 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 la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Denise Micaela Costales Dillon

Código: 206781

Cédula de identidad: 1722165667

Lugar y fecha: 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## **UNPUBLISHED DOCUMENT**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

Los hidrogeles de quitosano y almidón oxidado son materiales de gran importancia en biomedicina debido a sus aplicaciones en los procesos de liberación controlada de fármacos. Sin embargo, estas matrices son inestables a condiciones fisiológicas debido a su tendencia a hidrolizarse. En este sentido, en el presente trabajo de investigación se plantea la preparación de nuevos hidrogeles a partir quitosano funcionalizado con cianoguanidina (CHCG) y almidón de yuca oxidado (AO), con el fin de estudiar sus propiedades y compararlas con las de los hidrogeles de quitosano nativo. Se diseñó un nuevo método de funcionalización para el quitosano en el cual se utiliza diferentes concentraciones de cianoguanidina. Posteriormente, se formaron hidrogeles cambiando la concentración de almidón, polímero y cianoguanidina. Finalmente, para caracterizar los materiales obtenidos se realizaron diferentes FTIR, y para analizar las propiedades de los hidrogeles, se llevó a cabo pruebas de hinchamiento.

Los FTIR del polímero CHCG demuestran un aumento significativo en los grupos amino, lo cual ayuda a la formación de bases de Schiff. Los resultados del análisis de estabilidad revelan que la cantidad de polímero CHCG y la proporción de quitosano-cianoguanidina (CH- CG) en el hidrogel son las variables influyentes. En concreto, los hidrogeles con una relación en masa AO:CHCG de 1:1 y 1:2 y una relación másica CH-CG de 1:0.1, muestran la mayor estabilidad comparados con los hidrogeles de quitosano nativo. Con estos resultados, se puede concluir que los hidrogeles AO:CHCG son más estables en el tiempo y por ende mejores candidatos para llevar a cabo estudios de liberación de sustancias.

**Palabras clave:** hidrogeles, quitosano, funcionalizado, cianoguanidina, almidón, oxidado, estabilidad.

## ABSTRACT

Chitosan and oxidized starch hydrogels are materials of great importance in biomedicine due to their applications in controlled drug release processes. However, these matrices are unstable at physiological conditions due to their tendency to hydrolyze. In this sense, the present research work proposes the preparation of new hydrogels from chitosan functionalized with cyanoguanidine (CHCG) and oxidized cassava starch (AO), to study their properties and compare them with those of native chitosan hydrogels. A new functionalization method was designed for chitosan, in which different concentrations of cyanoguanidine are used. Subsequently, hydrogels were formed by changing the concentration of starch, polymer and cyanoguanidine. Finally, to characterize the obtained materials, different FTIR were performed, and to analyze the properties of the hydrogels, swelling tests were carried out.

The FTIR of the CHCG polymer shows a significant increase in amino groups, which helps the formation of Schiff bases. The results of the stability analysis reveal that the amount of CHCG polymer and the ratio of chitosan-cyanoguanidine (CH-CG) in the hydrogel are the influential variables. Specifically, hydrogels with an AO:CHCG mass ratio of 1:1 and 1:2 and a CH-CG mass ratio of 1:0.1 show the highest stability compared to native chitosan hydrogels. With these results, it can be concluded that AO:CHCG hydrogels are more stable over time and thus better candidates for conducting substance release studies.

**Keywords:** hydrogels, chitosan, functionalized, cyanoguanidine, starch, oxidized, stability.

**TABLA DE CONTENIDO**

<b><i>Introducción</i></b> .....	<b>10</b>
<b><i>Materiales y métodos</i></b> .....	<b>4</b>
<b><i>Resultados y Discusión</i></b> .....	<b>4</b>
Análisis de funcionalización del quitosano con cianoguanidina y la influencia de la concentración mediante Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	4
Análisis del grado de oxidación del almidón de yuca mediante un FTIR.....	7
Análisis del desempeño de los hidrogeles.....	15
<b><i>Conclusiones</i></b> .....	<b>18</b>
<b><i>Referencias bibliográficas</i></b> .....	<b>20</b>
<b><i>Anexo A: Preparación solución PBS</i></b> .....	<b>22</b>
<b><i>Anexo B: Control de Formación de Polimero CHCG</i></b> .....	<b>22</b>
<b><i>Anexo C: FTIR de hidrogeles formados</i></b> .....	<b>23</b>
<b><i>Anexo D: Datos recopilados en la etapa de hinchamiento</i></b> .....	<b>24</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Matriz guía para la formación de hidrogeles AO-CHCG, aquí se muestra . El número ubicado en cada columna representa la relación en masa AO:CHCG de cada hidrogel. La letra en cada fila corresponde a la proporción de cianoguanidina en el polímero CHCG. ....	5
Tabla 2. Análisis de varianza con un intervalo de confianza del 95%. Se presenta un análisis de la relevancia en el porcentaje de hinchamiento de las siguientes variables: Composición másica del hidrogel (AO:P), composición del polímero (CHCG) y el tiempo en horas. También se tomó en cuenta la influencia en el hinchamiento de la relación entre: AO:P y CHCG, AO:P y el tiempo, y CHCG y el tiempo. ....	14
Tabla 3. Análisis de agrupación de información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%. En esta tabla se analiza la influencia de la composición del hidrogel. ....	14
Tabla 4. Análisis de Comparaciones por parejas de Tukey: CHCG con una confianza del 95% .....	14
Tabla 5. Pesos en mg promediados de cada hidrogel durante el proceso de hinchamiento a lo largo de 72 horas. ....	24
Tabla 6. Tabla de desviaciones estándar calculadas a partir de los pesos no promediados de los hidrogeles.....	24



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de reacción entre el quitosano y la cianoguanidina en el proceso de funcionalización .....	4
Figura 2. Espectros FTIR de la funcionalización del polímero quitosano (CH)-cianoguanidina (CG). 1a: cianoguanidina, 1b: quitosano nativo, 1c: CH-CG proporción 1:1, 1d: CH-CG proporción 1:0.5, 1e: CH-CG proporción 1:0.1 .....	5
Figura 3. Espectros FTIR del proceso de oxidación de almidón de yuca. En el recuadro se presenta una ampliación de las bandas correspondientes al grupo aldehído ( $1640\text{ cm}^{-1}$ ) y C-O ( $1000\text{ cm}^{-1}$ ) .....	7
Figura 4. Matriz de hidrogeles AO-CHCG formados siguiendo la guía de la tabla 1. Las imágenes fueron tomadas a los 15 minutos de entrecruzamiento. ....	8
Figura 5. Espectros FTIR del hidrogel 2A (AO-CHCG) formado y seco y sus respectivos controles. 5a: AN-CH, 5b: AN-CHCG, 5c: AO-CH. 5d: AO-CHCG .....	9
Figura 6. Cinética de hinchamiento de hidrogeles de composición AO-CHCG de 2:1, a las tres diferentes proporciones de quitosano-cianoguanidina (6a: 1A, 6b: 1B y 6c: 1C). Se presenta también el control de almidón oxidado-quitosano 2:1 (AO-CH).....	11
Figura 7. Cinética de hinchamiento de hidrogeles de composición AO-CHCG de 2:1, a las tres diferentes proporciones de quitosano-cianoguanidina (7a: 2A, 7b: 2B y 7c: 2C). Se presenta también el control de almidón oxidado-quitosano 2:1 (7d: AO-CH).....	11
Figura 8. Cinética de hinchamiento de hidrogeles de composición AO-CHCG de 2:1, a las tres diferentes proporciones de quitosano-cianoguanidina (8a: 3A, 8b: 3B y 8c: 3C). Se presenta también el control de almidón oxidado-quitosano 2:1 (8d:AO-CH). ....	12
Figura 9. FTIR de la formación del polímero cuando se usa ácido acético y cuando se usa HCl. Se incluye el control negativo del quitosano nativo.....	34
Figura 10. Conjunto de FTIR de todos los hidrogeles formados con el método experimental. El título representa la relación AO-CHCG. En cada gráfico, se incluye la relación CH-CG de cada hidrogel .....	23

## INTRODUCCIÓN

Los hidrogeles son redes tridimensionales de polímeros hidrofílicos entrecruzados que se hinchan con el agua (Wang et al., 2020) y que logran absorber gran cantidad de este líquido, incluso superando el 100% de su peso en seco (Soto & Oliva, 2012). La formación de hidrogeles o entrecruzamiento puede ocurrir mediante mecanismos químicos o físicos (Wang et al., 2020). En el caso de los hidrogeles formados químicamente, las cadenas de polímeros son entrecruzadas mediante enlaces covalentes (Wang et al., 2020) y la polimerización vía radicales libres en presencia de agentes entrecruzantes (Wang et al., 2020). En el caso de los hidrogeles formados por entrecruzamiento físico, las cadenas de polímeros se unen como resultado de diversas interacciones intermoleculares (Wang et al., 2020).

Con relación a los métodos de entrecruzamiento químico, uno que ha sido ampliamente abordado está relacionado con la formación de bases de Schiff. Esta reacción involucra enlaces imino covalentes que se forman por la reacción entre grupos amino y grupos aldehído (J. Xu et al., 2019). Es común que se utilice materiales de origen natural como el almidón o la pectina (Neufeld & Bianco-Peled, 2017) para este tipo de reacción. Entre los muchos reportes de formación de hidrogeles mediante este método, se encontró que generalmente los polisacáridos o polímeros utilizados son modificados químicamente mediante oxidación (Ji et al., 2020) para introducir grupos aldehído o grupos nucleofílicos, los cuales luego reaccionan y forman bases de schiff con derivados de quitosano (J. Xu et al., 2019). Otro ejemplo relevante es el estudio de los Hidrogeles formados a partir de la base de Schiff entre gelatina y polietilenglicol dibenzaldehído, los cuales tienen buena capacidad de liberación controlada de fármacos y rápida auto-regeneración [(Vahedi et al., 2018).

Como se ha mencionado, los hidrogeles tienen diversas aplicaciones que los convierten en uno de los materiales más importantes en biomedicina. Se sabe que estas matrices tienen la

capacidad de liberar sustancias de manera controlada (Vahedi et al., 2018) y proveen un ambiente similar al fisiológico para el crecimiento celular (J. Xu et al., 2019). Estas características han dado paso a varios avances en la medicina, siendo uno de los más relevantes la regeneración del cartílago articular. Mediante la implementación de hidrogeles, se logró la liberación sostenida de anhydroicaritin, un compuesto que permite la condrogénesis de las células madre de cartílago articular (Cui et al., 2023).

Dadas las importantes aplicaciones de estos biomateriales, un creciente interés en la formación de hidrogeles ha aparecido y dado paso a la búsqueda de nuevos compuestos aptos para la formación de bases de Schiff. El quitosano y el almidón son dos polímeros muy considerados por su abundancia, fácil acceso, biodegradabilidad y biocompatibilidad (Liu et al., 2021) (Zhao et al., 2022) (W. Xu et al., 2022). En la literatura, ya existen reportes acerca de la formación exitosa de hidrogeles entre quitosano y almidón oxidado, los cuales presentan propiedades mecánicas interesantes como buen hinchamiento, rápida regeneración de su matriz y viscoelasticidad. Así mismo, se ha descrito que, para mejorar la reactividad en el proceso, se utilizan derivados de quitosano o el mismo funcionalizado con O-amina (Shebl et al., 2018).

Aunque los hidrogeles de quitosano y almidón oxidado parezcan la mejor opción dado lo descrito anteriormente, existen ciertas limitaciones. Se sabe que este tipo de hidrogeles son inestables a condiciones fisiológicas debido a que las bases de Schiff entre aminas primarias y aldehídos son reversibles (Ding et al., 2019), es decir están sujetas a hidrólisis con un tiempo de vida media corto (Cordes & Jencks, 1963). Se ha reportado que las bases de Schiff formadas con aminas alifáticas decaen en aproximadamente 1 a 2 minutos en condiciones de hidrólisis (Cordes & Jencks, 1963), lo que hace urgente la búsqueda de una alternativa más estable.

Es por eso que, el objetivo del presente trabajo es formar hidrogeles a partir de un polímero de quitosano-cianoguanidina (CHCG) y almidón de yuca oxidado. Basados en la estructura de la cianoguanidina, es de esperar que la base de Schiff generada sea más estable

debido a la presencia de resonancia en el sistema conjugado de dobles enlaces. Para lograr esto, se funcionalizó quitosano con cianoguanidina, el cual se usó posteriormente para formar hidrogeles entre CHCG y almidón de yuca oxidado. finalmente, se analizó la estabilidad de los hidrogeles formados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Funcionalización del quitosano con cianoguanidina (CHCG).**

Para esta esta fase se utilizó el protocolo propuesto por Veisi et. al. con modificaciones (Veisi et al., 2016). Se ocupó quitosano Sigma-Aldrich, CAS No. 9012-76-4, derivado de cascara de camarón y con  $\geq 75\%$  de deacetilación. En cuanto a la cianoguanidina, también es Sigma-Aldrich CAS No. 461-58-5.

Primero, se preparó una solución de quitosano al 2% w/v en ácido acético al 1.5% v/v, para luego añadir cianoguanidina en una proporción másica definida. Se precipitó el polímero con suficiente NaOH para neutralizar al ácido acético y luego con etanol al 96% para recuperar todo lo reaccionado. Se lavó el polímero obtenido con DMF durante una hora y se dejó secar a 40 °C. Luego, se realizó un FTIR (Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier) del material seco obtenido. La relación másica de quitosano (CH)-cianoguanidina(CG) se estableció en los niveles 1:1, 1:0.5 y 1.0.1, de acuerdo con experimentación previa.

### **Oxidación de almidón comercial de yuca**

Se utilizó el protocolo propuesto por Laufer, con modificaciones (Laufer, 2019). Se preparó una suspensión de almidón de yuca (AN) marca La Pradera y una solución de periodato de sodio, ambas al 5% p/v en agua. Luego se juntaron ambas mezclas a una relación volumétrica almidón:periodato de 2:0.5. La reacción se llevó a cabo durante 5 horas, bajo agitación moderada y protección de la luz. Se centrifugó la suspensión y se lavó cuatro veces el almidón oxidado (AO) obtenido con agua destilada. Se secó el producto a 40 °C y se realizó un FTIR.

## Formación de hidrogeles

Se utilizó el protocolo propuesto por Vahedi et. al. (Vahedi et al., 2018) con modificaciones. Primero, se elaboró una solución al 2% p/v de polímero CHCG en ácido acético al 1.5% v/v. Posteriormente se ajustó el pH a 5.5. De la misma forma, se preparó una solución de almidón oxidado gelatinizado. Para esto, se llevó una suspensión de almidón al 4% p/v a 90 °C y se esperó a que esta se volviera transparente. Se mezcló la solución de almidón oxidado gelatinizado y la solución de polímero CHCG siguiendo la matriz que se presenta en la Tabla 1.

*Tabla 1. Matriz guía para la formación de hidrogeles AO-CHCG, aquí se muestra . El número ubicado en cada columna representa la relación en masa AO:CHCG de cada hidrogel. La letra en cada fila corresponde a la proporción de cianoguanidina en el polímero CHCG.*

		AO : CHCG		
		1	2	3
CH : CG		2:1	1:1	1:2
A	1:1	1A	2A	3A
B	1:0.5	1B	2B	3B
C	1:0.1	1C	2C	3C

Se secó todos los hidrogeles formados a 40 °C y se realizó un FTIR de cada uno.

## Prueba de hinchamiento

Para esta esta fase se utilizó el protocolo propuesto por Salazar et.al. (Salazar et al., 2019) con modificaciones. Se pesó en seco cada hidrogel y se colocó en una placa de pocillos con suficiente solución PBS (Anexo 1). Luego, los hidrogeles se incubaron a 37 °C, para después monitorear su peso cada hora por 3 horas. Posteriormente, los hidrogeles se pesaron

cada 24 horas hasta finalizar las 72 horas. Se calculó el porcentaje de hinchamiento con ecuación 1

$$SW = \frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100\% \quad (1)$$

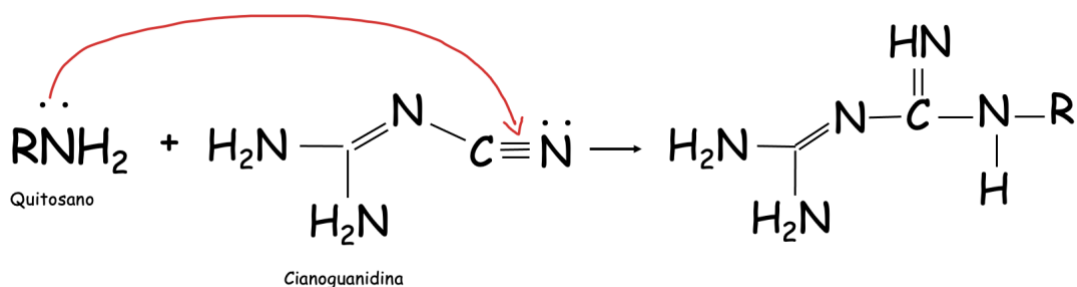
Donde SW es el porcentaje de hinchamiento,  $M_t$  es el peso de la muestra en un tiempo específico y  $M_0$  es el peso inicial de la muestra. Se realizó esta prueba por triplicado y se hizo promedio de los resultados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Preparación de polímeros principales

#### *Análisis de funcionalización del quitosano con cianoguanidina y la influencia de la concentración mediante Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).*

El método de funcionalización utilizado en este trabajo de investigación es nuevo ya que se realizaron modificaciones significativas al método propuesto por Veisi et. Al (2016). Como menciona Mahendiran et.al. (2022), la funcionalización es el proceso por el cual se añaden grupos funcionales a cualquier polímero o biomaterial. Al utilizar ácido acético en vez de HCl, se logra la correcta disolución del quitosano sin afectar a la funcionalización, ya que, al aumentar el pH, el grupo amino del quitosano no se protona y está disponible para unirse con la cianoguanidina. Este mecanismo de reacción se observa en la figura 1. En el FTIR del Anexo 2, se observa las diferencias entre ambos metodos de reacción mencionados.



*Figura 1. Mecanismo de reacción entre el quitosano y la cianoguanidina en el proceso de funcionalización*

Para analizar los resultados, se debe comprender que la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier es una técnica utilizada para obtener el espectro infrarrojo de compuestos sólidos, líquidos y gaseosos, lo cual permite observar grupos funcionales (Sindhu



et al., 2015). En la figura 1, se observa un arreglo de espectros FTIR de los polímeros realizados experimentalmente, junto con el espectro de la cianoguanidina y quitosano nativo.

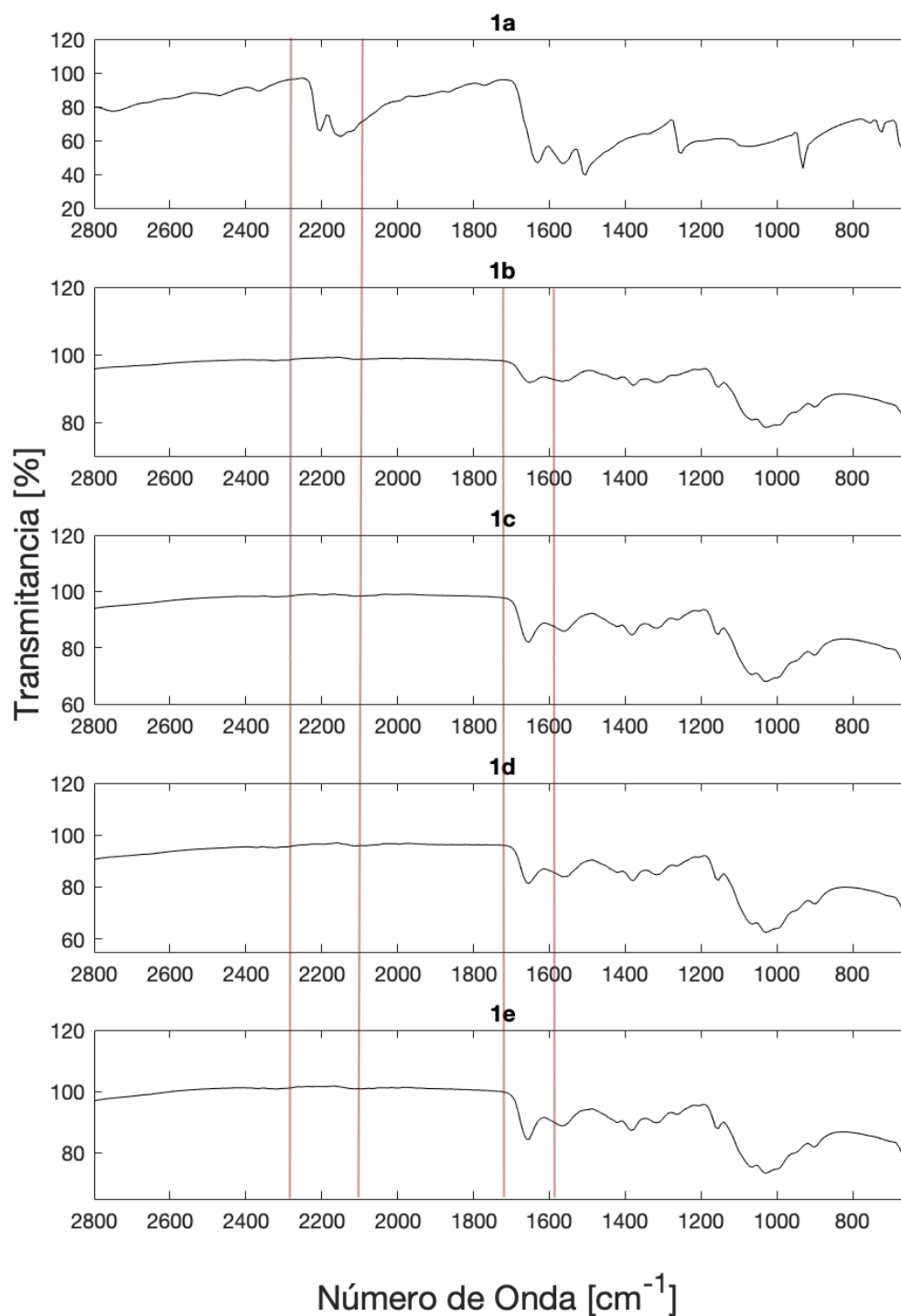
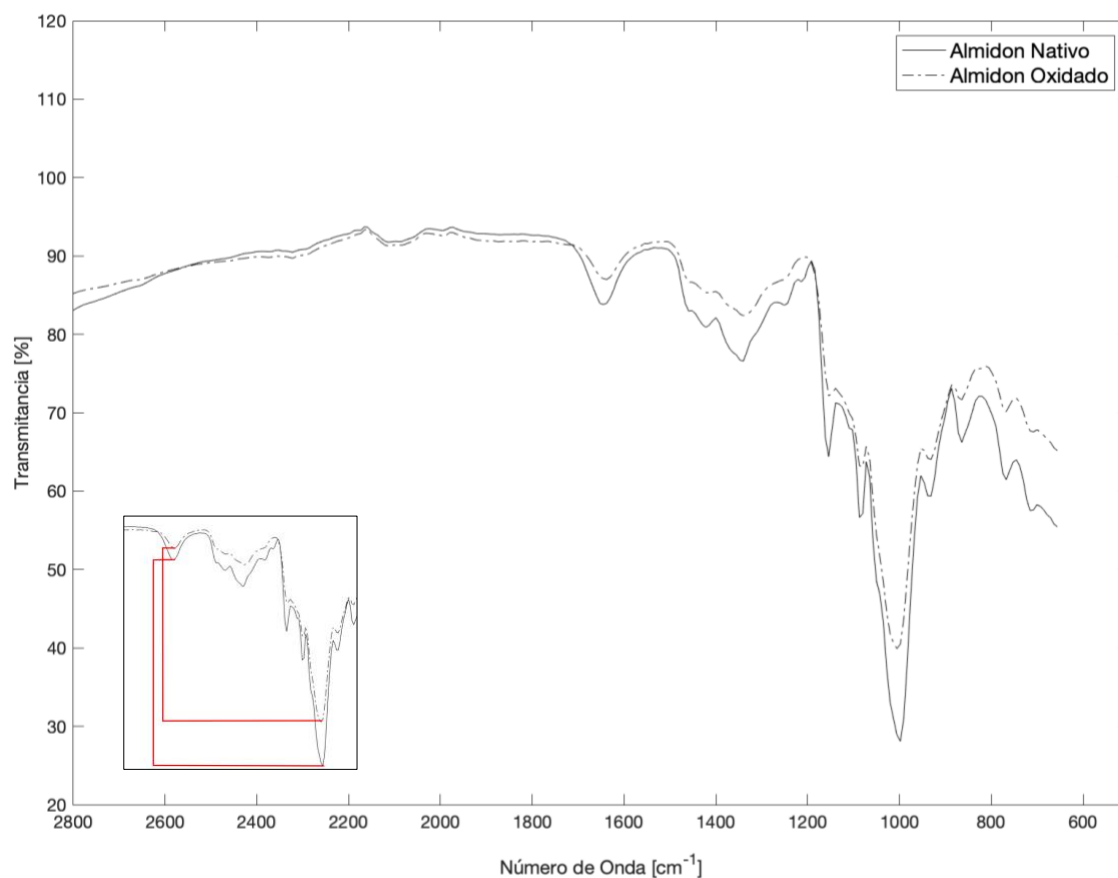


Figura 2. Espectros FTIR de la funcionalización del polímero quitosano (CH)-cianoguanidina (CG). 1a: cianoguanidina, 1b: quitosano nativo, 1c: CH-CG proporción 1:1, 1d: CH-CG proporción 1:0.5, 1e: CH-CG proporción 1:0.1

De acuerdo con lo presentado, si existió funcionalización del quitosano con cianoguanidina. Las figuras 1c, 1d y 1e muestran que existe un claro crecimiento en la banda a la altura de  $1652\text{ cm}^{-1}$  con respecto al FTIR del quitosano nativo. Este cambio demuestra un incremento de grupos iminos (bases de Schiff) (Bruice, 2011) debido a la cianoguanidina añadida. De la misma forma, la sección señalada a aproximadamente  $2200\text{ cm}^{-1}$  muestra que los grupos nitrilo ( $-\text{C}\equiv\text{N}$ ) (Bruice, 2011) de la cianoguanidina han desaparecido, por lo que se confirma la funcionalización del polímero y se demuestra que el lavado descrito en la sección 2.1 fue el adecuado, ya que se remueve toda la cianoguanidina.

Como se mencionó antes, el incremento de iminas es uno de los principales objetivos a conseguir para la formación de una base de Schiff más estable. Al tener más grupos amino disponibles, los aldehídos del almidón podrán formar más enlaces y por lo tanto se espera que los hidrogeles obtenidos sean más estables. El diseño experimental utilizado tuvo como objetivo evaluar el efecto de la cantidad de cianoguanidina en los posibles grados de funcionalización. Sin embargo, no existe diferencia visible en el FTIR, por lo que se extendió esta metodología hasta la formación y análisis de los hidrogeles.

### *Análisis del grado de oxidación del almidón de yuca mediante un FTIR*



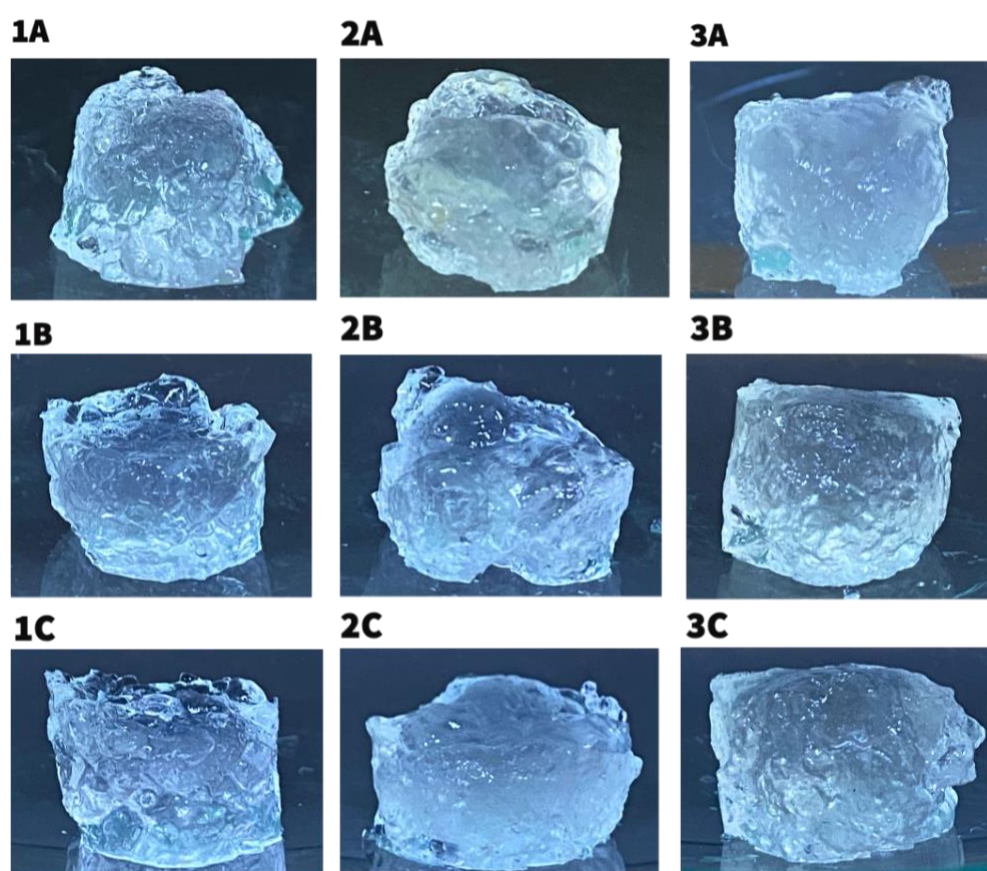
*Figura 3. Espectros FTIR del proceso de oxidación de almidón de yuca. En el recuadro se presenta una ampliación de las bandas correspondientes al grupo aldehído ( $1640\text{ cm}^{-1}$ ) y C-O ( $1000\text{ cm}^{-1}$ )*

A simple vista, no se puede observar un cambio en los espectros del almidón nativo y el almidón oxidado. Sin embargo, si existen diferencias sutiles. En la ampliación presentada en la figura 2 (recuadro), se puede observar una distancia medible en el eje Y entre las bandas señaladas a  $1640\text{ cm}^{-1}$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$ . Si se calcula la diferencia entre el valor en el eje y de la banda de aldehídos y el valor del eje y de la banda de C-O de ambos espectros, se puede conocer si en verdad hay diferencia entre ambos FTIR. La distancia entre bandas en el espectro del almidón nativo es de 55.05 y en el espectro del almidón oxidado es de 46.71, por lo que se

deduce que si existe un aumento de grupos aldehído cuando se utiliza el proceso de oxidación. Este incremento es un factor determinante para la formación de hidrogeles.

### Formación de hidrogeles

Las figuras 3 y 4 son los resultados de la formación de los hidrogeles de almidón oxidado y polímero CHCG. En la figura 3 se observan fotografías de los hidrogeles formados y en la figura 4 un FTIR de un hidrogel junto con sus respectivos controles.



*Figura 4. Matriz de hidrogeles AO-CHCG formados siguiendo la guía de la tabla 1. Las imágenes fueron tomadas a los 15 minutos de entrecruzamiento.*

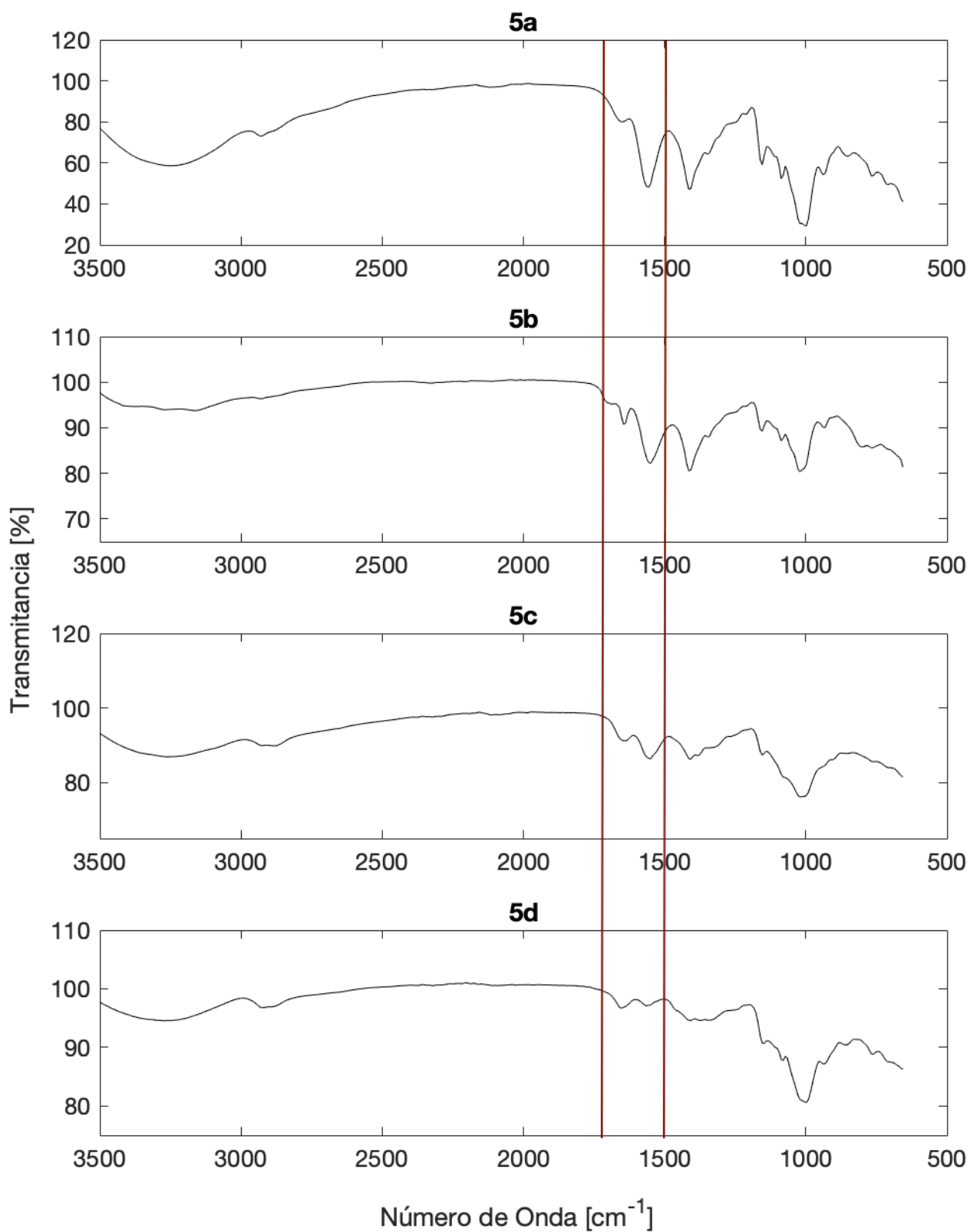


Figura 5. Espectros FTIR del hidrogel 2A (AO-CHCG) formado y seco y sus respectivos controles. 5a: AN-CH, 5b: AN-CHCG, 5c: AO-CH. 5d: AO-CHCG

En la figura 3 se observa que, para todas las variaciones de proporción, los hidrogeles se forman correctamente. También se puede observar que a medida que aumenta la cantidad de CHCG en el volumen total del hidrogel, este se vuelve más turbio y firme. En cuanto al método propuesto, al observar la figura 4 se puede comprobar que se han formado bases de Schiff. En la sección señalada se ve un aumento proporcional de los grupos imino, ya que la banda a 1650  $\text{cm}^{-1}$  crece y supera a la banda de 1550  $\text{cm}^{-1}$  a medida que se cambia de almidón nativo a almidón oxidado y de quitosano nativo a polímero CHCG.

De la misma forma que en la figura 2, a simple vista no se nota un cambio. Sin embargo, en cada gráfico se puede observar una distancia medible en el eje y. Para el gráfico AN-CH la diferencia entre el pico 1640 y 1550 es 31.94. Para el polímero AN-CHCG, la diferencia se reduce a 14.49. Al formar el hidrogel de almidón oxidado con quitosano nativo, la diferencia es de 7.85. Finalmente, al formar el hidrogel propuesto (AO-CHCG) la diferencia es de  $-0.37$ , lo que demuestra que efectivamente el pico de 1640 es mayor. Esta inversión de picos indica un aumento en los grupos imino, los cuales corresponden a los grupos funcionales encontrados en una base de Schiff, mecanismo principal de entrecruzamiento.

### **Estabilidad de los hidrogeles en condiciones fisiológicas**

Para evaluar la posible estabilidad de los hidrogeles en condiciones fisiológicas, se estudiaron las cinéticas de hinchamiento. En las figuras 5-7, se observan las cinéticas de hinchamiento de los hidrogeles elaborados.

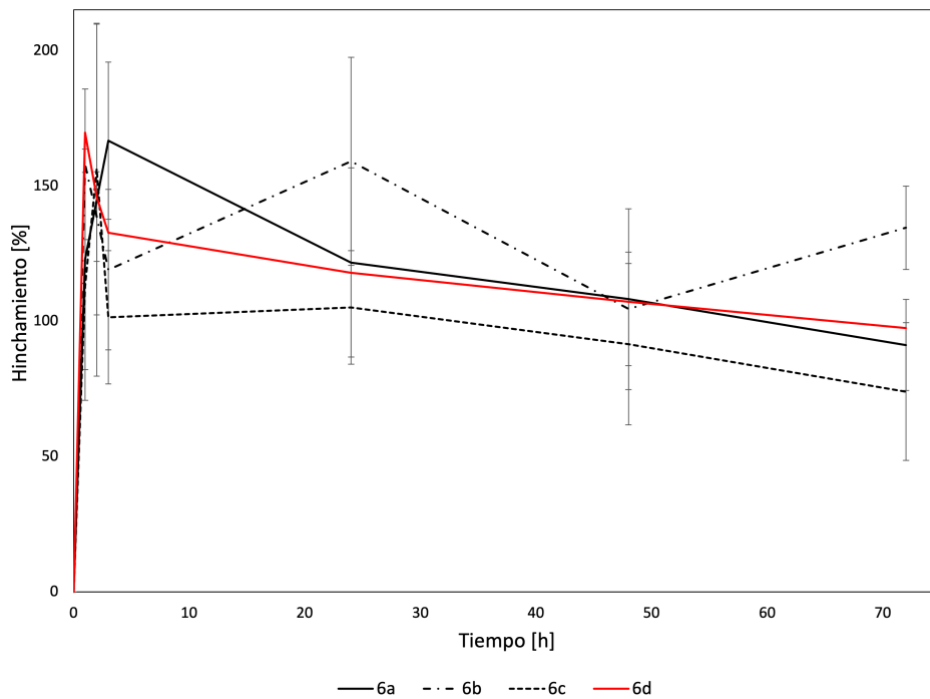


Figura 6. Cinética de hinchamiento de hidrogeles de composición AO-CHCG de 2:1, a las tres diferentes proporciones de quitosano-cianoguanidina (6a: 1A, 6b: 1B y 6c: 1C). Se presenta también el control de almidón oxidado-quitosano 2:1 (AO-CH).

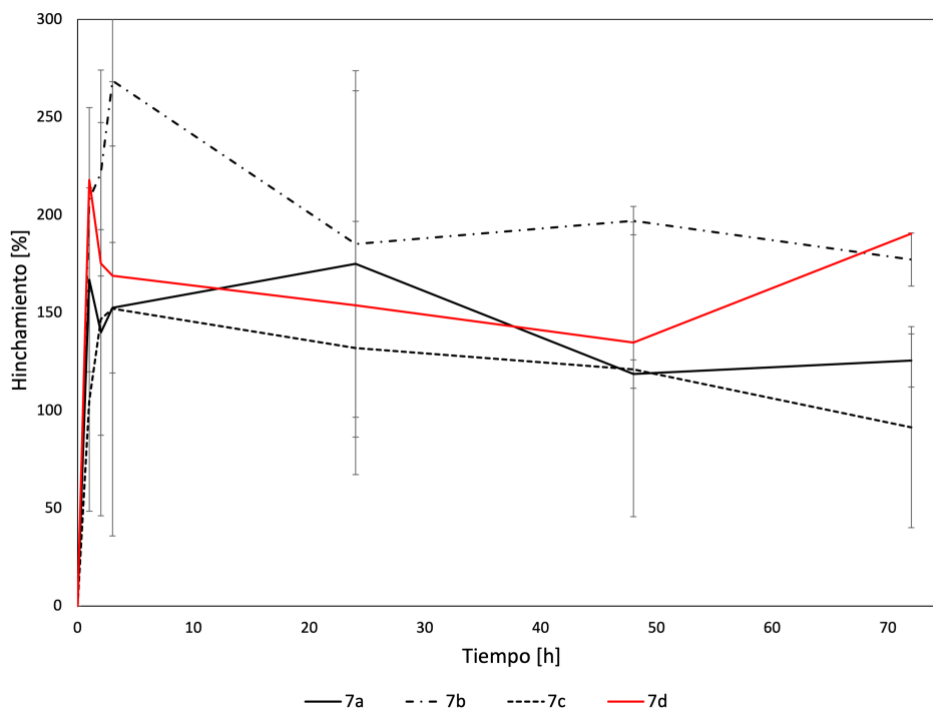


Figura 7. Cinética de hinchamiento de hidrogeles de composición AO-CHCG de 2:1, a las tres diferentes proporciones de quitosano-cianoguanidina (7a: 2A, 7b: 2B y 7c: 2C). Se presenta también el control de almidón oxidado-quitosano 2:1 (7d: AO-CH).

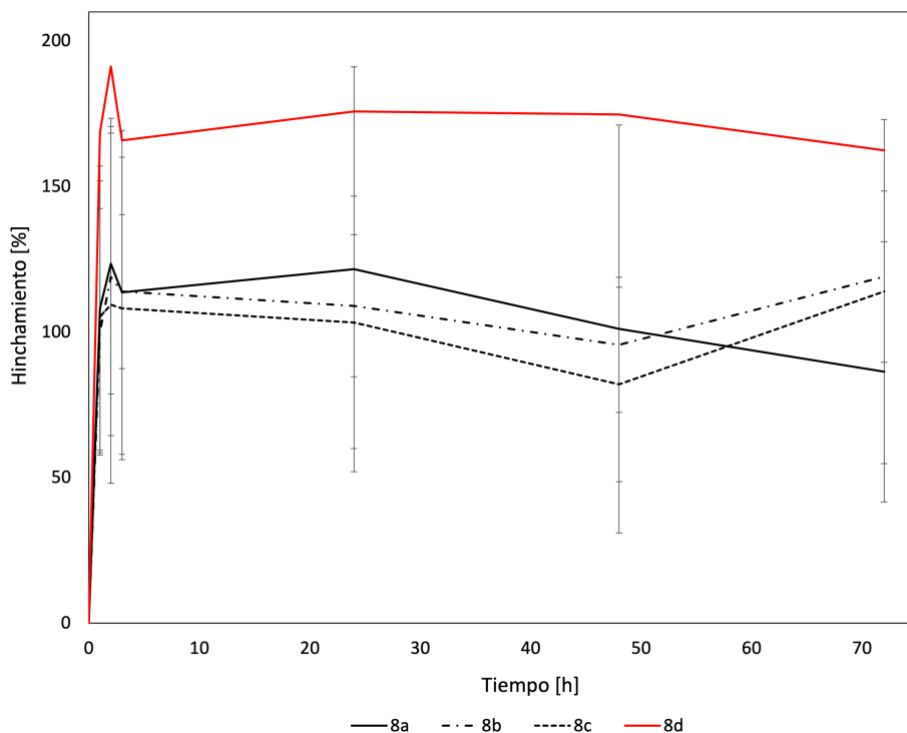


Figura 8. Cinética de hinchamiento de hidrogeles de composición AO-CHCG de 2:1, a las tres diferentes proporciones de quitosano-cianoguanidina (8a: 3A, 8b: 3B y 8c: 3C). Se presenta también el control de almidón oxidado-quitosano 2:1 (8d:AO-CH).

En la figura 5 se aprecia un drástico crecimiento de más del 150% en la primera hora. Sin embargo, para los hidrogeles de proporción CH-CG 1:0.5 y 1:0.1 se presenta un decrecimiento de similares características en la segunda hora. Para el hidrogel 1A se observa un crecimiento progresivo en las primeras tres horas y luego un deshincharamiento prominente para las 24 horas. Los hidrogeles 1A y 1C presentan un decrecimiento relativamente estable hasta alcanzar las 72 horas, mientras que el hidrogel 1B se hincha y deshincha sin ningún patrón.

Al comparar los tres hidrogeles con el control, se observa que su hinchamiento es mucho más inestable comparado con el del hidrogel AO-CH. Se puede apreciar que el deshincharamiento de los nuevos hidrogeles es de casi un 50%, mientras que el deshincharamiento



del hidrogel de quitosano es de aproximadamente 30%. Por lo tanto, a esta proporción los hidrogeles no presentan un mejor comportamiento.

Si se continua con el análisis, se observa que en la figura 6 existe un comportamiento similar en cuanto a los hidrogeles 2A y 2B. El primer hidrogel muestra un hinchamiento de más del 150% a la primera hora, con un posterior deshinchamiento aleatorio e irregular. En cuanto al segundo hidrogel mencionado, se muestra un crecimiento progresivo las primeras 3 horas y luego un deshinchamiento irregular hasta las 72 horas. Por otro lado, el hidrogel en 2C se hincha de manera paulatina hasta llegar a las 3 horas, a partir de ese momento presenta un deshinchamiento progresivo, estable y suave. Al comparar con el control AOCH, tanto el hidrogel 2A como el 2B muestran un hinchamiento igual de irregular y abrupto. Todo lo contrario ocurre con el hidrogel 2C que a pesar de no hincharse tanto, es más estable que el control y que los demás hidrogeles mencionados.

Finalmente, en la figura 7 se observa que todos los hidrogeles presentan menor grado de hinchamiento comparados con los hidrogeles de los anteriores gráficos y sobre todo con el control. Los hidrogeles de proporción 3A y 3B tienen un cambio en su porcentaje de hinchamiento ligeramente abrupto en las primeras tres horas. Luego su comportamiento de deshinchamiento es relativamente estable. Para el hidrogel 3C ocurre lo mismo que en el presentado en la figura 6, el hinchamiento de las primeras 3 horas es suave y uniforme, luego se sigue deshinchando de la misma manera y muestra una tendencia a hincharse de nuevo.

### **Análisis estadístico**

Las tablas 2-4 presentan los resultados del análisis estadístico realizado para entender de qué forma afectan las variables modificadas (tiempo, formulación del hidrogel, y composición del polímero) en el porcentaje de hinchamiento. La tabla 2 muestra los resultados de ANOVA de las variables modificadas en el experimento. La tabla 3 recopila los datos del

análisis de Tukey realizado en los datos de la composición del hidrogel y la tabla 4 muestra los datos del análisis de Tukey realizado con los datos de la composición del polímero.

*Tabla 2. Análisis de varianza con un intervalo de confianza del 95%. Se presenta un análisis de la relevancia en el porcentaje de hinchamiento de las siguientes variables: Composición másica del hidrogel (AO:P), composición del polímero (CHCG) y el tiempo en horas. También se tomó en cuenta la influencia en el hinchamiento de la relación entre: AO:P y CHCG, AO:P y el tiempo, y CHCG y el tiempo.*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
AO: P	2	30790	15394,9	8,14	0,000
CHCG	2	15822	7911,2	4,18	0,017
t (h)	5	6156	1231,3	0,65	0,661
AO: P*CHCG	4	8002	2000,5	1,06	0,380
AO: P*t (h)	10	4041	404,1	0,21	0,995
CHCG*t (h)	10	1389	138,9	0,07	1,000
Error	128	242182	1892,0		
Falta de ajuste	20	7059	352,9	0,16	1,000
Error puro	108	235123	2177,1		
Total	161	308382			

*Nota: AO:P representa almidón oxidado: CHCG*

*Tabla 3. Análisis de agrupación de información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%. En esta tabla se analiza la influencia de la composición del hidrogel.*

<b>AO: P</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
2:1	54	132,669	A
1:2	54	129,510	A
1:1	54	101,973	B

*Tabla 4. Análisis de Comparaciones por parejas de Tukey: CHCG con una confianza del 95%*

<b>CHCG</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
1:0.5	54	131,162	A
1:1	54	125,143	B
1:0.1	54	107,846	B

Al observar la tabla 3, se puede concluir que las únicas variables que influyen al porcentaje de hinchamiento son la composición del hidrogel (AO:P) y la composición del polímero (CHCG). El análisis de ANOVA realizado toma en cuenta solo los valores p menores

a 0.05 debido a su intervalo de confianza, por lo que ni el tiempo ni las interacciones entre las variables tienen un impacto significativo. Estas observaciones sustentan el análisis del desempeño de los hidrogeles, ya que las mismas variables muestran un comportamiento influyente.

En cuanto a la tabla 3, se puede deducir que la única composición de hidrogel con diferencias estadísticas significativas es la de 1:1, la cual resulta ser la que menor porcentaje de hinchamiento presenta. Este comportamiento puede ocurrir debido a las altas fluctuaciones en el porcentaje de hinchamiento que se muestran en la figura 5. Si se observa la tabla 4, se deduce que solo existen diferencias entre los hidrogeles con polímero 1:0.5 y 1:0.1. Así mismo, los hidrogeles con composición AO:CHCG(1:0.1) son los que menos hinchamiento presentan. Los hidrogeles 1C, 2C y 3C (tabla 1), tienen menor hinchamiento debido a que no sobrepasan el 125% y no tienen fluctuaciones de gran magnitud.

### ***Análisis del desempeño de los hidrogeles***

El comportamiento de hinchamiento descrito en los anteriores párrafos ocurre debido a diferencias en la morfología del hidrogel, su composición y su tendencia de rehinchamiento. En primer lugar, Yacob y Hashim (2014) mencionan que si la estructura interna del hidrogel tiene poros más pequeños, este se volverá más firme y por lo tanto absorberá menos líquido. En la figura 5 se observa un gran aumento en el porcentaje de hinchamiento en las primeras horas, lo que sugiere que la estructura está compuesta de poros más grandes. Siguiendo con esta tendencia, las demás figuras muestran que al aumentar la cantidad de polímero CHCG en el hidrogel, el porcentaje de hinchamiento parece reducirse, por lo que se puede concluir que el tamaño de los poros en la matriz es menor. De la misma forma, se observa que los hidrogeles formados con una proporción CH-CG de 1:0.1 (2C y 3C) son los que menos porcentaje de

hinchamiento presentan, por lo que se deduce que son los más densos, estrechos y con tamaño de poro más pequeño.

Tomando en cuenta el análisis realizado en (Yacob & Hashim, 2014), se puede suponer que en este caso también existe una relación entre el tamaño de los poros y la estabilidad de los hidrogeles. A mayor tamaño de poro, mayor parece ser la fluctuación en el porcentaje de hinchamiento, como se denota en las figuras 5 y 6. Los hidrogeles de la figura 7 que tienen el tamaño de poro más pequeño como se mencionó anteriormente, muestran una mayor estabilidad.

De la misma forma, la composición del hidrogel no solo influye en el tamaño del poro si no también en el proceso de formación del hidrogel. En primer lugar, al funcionalizar quitosano con cianoguanidina se aumenta los grupos funcionales disponibles para formar bases de Schiff, lo que determina que los enlaces se formen rápida y abundantemente y que no haya uniformidad en la gelificación. Al observar las figuras 5 y 6, se deduce que la gran cantidad de solución de almidón oxidado no se mezcló de manera adecuada con el polímero antes de que se formara el hidrogel. La matriz resultante por lo tanto es dispareja y está sujeta a degradación cuando el almidón sin enlazar se disuelve en el PBS. Los hidrogeles de proporción AO-CHCG 1:2 (3A, 3B y 3C) tienden a ser los más estables debido al bajo volumen de solución de almidón oxidado. La composición del polímero también influye drásticamente en la estabilidad. Los hidrogeles de proporción CHCG 1:0.1 demuestran ser los más estables comparados con los demás hidrogeles y su respectivo control elaborado solo con quitosano.

Finalmente, la fluctuación en el hinchamiento también está controlada por la tendencia de los hidrogeles a rehincharse. Existe un fenómeno común en los hidrogeles de quitosano en el cual el pH determina la manera en la que la matriz absorbe líquido. A pH 7 o mayor, las aminas del polímero se protonan causando que el este pierda su carga y se vuelva insoluble (Budianto & Amalia, 2020). Esto hace que los hidrogeles se encojan y sean inestables hasta

que se encuentren en equilibrio. Este fenómeno reportado en los estudios de Budianto y Amelia (2020) es una de las causas de del hinchamiento por partes de los hidrogeles y de su consecuente inestabilidad.

Este y los otros dos factores de control de hinchamiento mencionados, determinan la funcionalidad del hidrogel. Con un tamaño de poro más pequeño, se obtendrá menos fluctuación en el hinchamiento y por lo tanto una liberación de fármacos más controlada. Lo mismo ocurre al añadir cianoguanidina en proporción 1:0.1. Así mismo, al reducir la cantidad de almidón oxidado en la mezcla, se obtienen hidrogeles más uniformes y menos susceptibles a degradación al comienzo del proceso de hinchamiento, lo cual permite tener un proceso de liberación predecible. Por último, a pesar de que la tendencia de rehinchamiento puede afectar la liberación del fármaco al reabsorberlo, si se controla las demás variables que provocan inestabilidad, este efecto puede ser disminuido.

## CONCLUSIONES

En conclusión, utilizando una nueva metodología basada en el uso de ácido acético en vez de ácido clorhídrico, se logra la funcionalización exitosa de quitosano con cianoguanidina a proporciones en masa de 1:1, 1:0.5 y 1:0.1 y esto se demuestra mediante un FTIR. De la misma forma, se comprueba que el método de oxidación es el adecuado para aumentar los grupos aldehído del almidón mediante otro análisis FTIR.

Así pues, mediante espectros FTIR y análisis de cinética de hinchamiento se demuestra que el proceso de funcionalización si influencia la estabilidad de los hidrogeles de quitosano. Los hidrogeles más estables obtenidos son: aquel con composición AO:CHCG de 1:1 y relación másica 1:0.1 y aquel con composición AO:CHCG de 1:2 y relación másica 1:0.1 ya que su porcentaje de hinchamiento presenta muy poca fluctuación abrupta en las primeras horas y una tendencia estable durante el resto del tiempo. Este comportamiento ocurre debido a la composición másica de los hidrogeles, siendo la alta cantidad de polímero el factor clave. Igualmente, queda demostrado que el grado de funcionalización del polímero contribuye a la estabilidad del hidrogel, ya que a proporciones másicas muy altas el hidrogel es inestable.

Finalmente, el análisis estadístico de ANOVA corrobora la discusión de los resultados, ya que demuestra que efectivamente las variables influyentes en el porcentaje de hinchamiento son la composición del hidrogel (AO-P) y la composición del polímero (CHCG). Las cuales actúan por separado. De la misma manera, el análisis de Tukey demuestra que los hidrogeles con composición másica AO:CHCG de 2:1 tienen el menor hinchamiento si se toma en cuenta solamente la composición del hidrogel. Y los hidrogeles con composición másica CH-CG de 1:0.1 son los más estables si se toma en cuenta solamente el grado de funcionalización.

Se puede decir que los resultados obtenidos permitirán un mejor aprovechamiento biomédico de los hidrogeles a base de quitosano. La mejora en la estabilidad de los hidrogeles

durante el hinchamiento, está directamente relacionada con el desempeño en procesos de liberación de sustancias. Por lo que nuevos experimentos de dosificación de fármacos podrán ser llevados a cabo con más seguridad. A pesar de que los resultados obtenidos son prometedores, estos siguen siendo preliminares. Se recomienda realizar pruebas de liberación de acetaminofén utilizando los hidrogeles más estables mencionados para corroborar el experimento y también se recomienda trabajar en la caracterización del polímero funcionalizado y los todos hidrogeles formados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bruice, P. Y. (2011). Beauchamp Spectroscopy Tables 1. *Organic Chemistry*, 2620, A-16, A17. [http://www.cpp.edu/~psbeauchamp/pdf/spec\\_ir\\_nmr\\_spectra\\_tables.pdf](http://www.cpp.edu/~psbeauchamp/pdf/spec_ir_nmr_spectra_tables.pdf)
- Budianto, E., & Amalia, A. (2020). Swelling behavior and mechanical properties of Chitosan-Poly(N-vinyl-pyrrolidone) hydrogels. *Journal of Polymer Engineering*, 40(7), 551–560. <https://doi.org/10.1515/polyeng-2019-0169>
- Cordes, E. H., & Jencks, W. P. (1963). The Mechanism of Hydrolysis of Schiff Bases Derived from Aliphatic Amines. *Journal of the American Chemical Society*, 85(18), 2843–2848. <https://doi.org/10.1021/ja00901a037>
- Cui, P., Pan, P., Qin, L., Wang, X., Chen, X., Deng, Y., & Zhang, X. (2023). Nanoengineered hydrogels as 3D biomimetic extracellular matrix with injectable and sustained delivery capability for cartilage regeneration. *Bioactive Materials*, 19(March 2022), 487–498. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.03.032>
- Ding, X., Li, G., Xiao, C., & Chen, X. (2019). Enhancing the Stability of Hydrogels by Doubling the Schiff Base Linkages. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 220(3), 1800484. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/macp.201800484>
- Ji, Y., Lin, X., & Yu, J. (2020). Preparation and characterization of oxidized starch-chitosan complexes for adsorption of procyanidins. *LWT*, 117. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108610>
- Laufer, A. (2019). *Desarrollo y Caracterización de un nuevo Termoplástico a base de Almidón de Yuca Oxidado y Alcohol de Polivinilo para su Potencial Uso en Extrusión de Plástico* [Universidad San Francisco de Quito]. <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/9160/1/132741.pdf>
- Liu, S., Wang, X., Peng, Y., Wang, Z., & Ran, R. (2021). Highly Stretchable, Strain-Sensitive, and Antifreezing Macromolecular Microsphere Composite Starch-Based Hydrogel. *Macromolecular Materials and Engineering*, 306(9). <https://doi.org/10.1002/mame.202100198>
- Mahendiran, B., Azeez, N. A., Muthusamy, S., & Krishnakumar, G. S. (2022). Chapter 9 - Polymer-based bionanomaterials for targeted drug delivery. In A. Barhoum, J. Jeevanandam, & M. K. B. T.-F. of B. Danquah (Eds.), *Micro and Nano Technologies* (pp. 241–271). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824147-9.00009-1>
- Neufeld, L., & Bianco-Peled, H. (2017). Pectin–chitosan physical hydrogels as potential drug delivery vehicles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101(August), 852–861. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.167>
- Salazar, A. X., Alvarez, J., & Mora, J. (2019). *Elaboración de hidrogeles de Alginato de sodio/Gelatina para la liberación controlada de una proteína modelo con posibles aplicaciones biomédicas*. Universidad San Francisco de Quito.
- Shebl, A., Omer, A. M., & Tamer, T. M. (2018). Adsorption of cationic dye using novel O-amine functionalized chitosan schiff base derivatives: Isotherm and kinetic studies. *Desalination and Water Treatment*, 130, 132–141. <https://doi.org/10.5004/dwt.2018.22986>
- Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2015). *Chapter 17 - Microbial Poly-3-Hydroxybutyrate and Related Copolymers* (A. Pandey, R. Höfer, M. Taherzadeh, K. M. Nampoothiri, & C. B. T.-I. B. & W. B. Larroche (eds.); pp. 575–605). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00019-7>
- Soto, D., & Oliva, H. (2012). Métodos para preparar hidrogeles químicos y físicos basados en



- almidón: Una revisión. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 32, 154–175. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0255-69522012000200002&nrm=iso](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0255-69522012000200002&nrm=iso)
- Vahedi, M., Barzin, J., Shokrolahi, F., & Shokrollahi, P. (2018). Self-Healing, Injectable Gelatin Hydrogels Cross-Linked by Dynamic Schiff Base Linkages Support Cell Adhesion and Sustained Release of Antibacterial Drugs. *Macromolecular Materials and Engineering*, 303(9), 1–10. <https://doi.org/10.1002/mame.201800200>
- Veisi, H., Ghadermazi, M., & Naderi, A. (2016). Biguanidine-functionalized chitosan to immobilize palladium nanoparticles as a novel, efficient and recyclable heterogeneous nanocatalyst for Suzuki-Miyaura coupling reactions. *Applied Organometallic Chemistry*, 30(5), 341–345. <https://doi.org/10.1002/aoc.3437>
- Wang, W., Narain, R., & Zeng, H. (2020). *Chapter 10 - Hydrogels* (R. B. T.-P. S. and N. Narain (ed.); pp. 203–244). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816806-6.00010-8>
- Xu, J., Liu, Y., & Hsu, S.-H. (2019). Hydrogels Based on Schiff Base Linkages for Biomedical Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(16). <https://doi.org/10.3390/molecules24163005>
- Xu, W., Gao, X., Tan, H., Li, S., Zhou, T., Li, J., & Chen, Y. (2022). Covalent and biodegradable chitosan-cellulose hydrogel dressing containing microspheres for drug delivery and wound healing. *Materials Today Communications*, 33. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.104163>
- Yacob, N., & Hashim, K. (2014). Morphological effect on swelling behaviour of hydrogel. *AIP Conference Proceedings*, 1584(1), 153–159. <https://doi.org/10.1063/1.4866123>
- Zhao, W., Huang, B., Zhu, L., Feng, X., Xu, J., Zhang, H., & Yan, S. (2022). Printable hydrogels based on starch and natural rubber latex with high toughness and self-healing capability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 218, 580–587. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.148>

## ANEXO A: PREPARACIÓN SOLUCIÓN PBS

Para 1L de solución 1X se necesita:

- 8 g de NaCl
- 0.2 g de KCl
- 1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Ajustar pH a 7

## ANEXO B: CONTROL DE FORMACIÓN DE POLIMERO CHCG

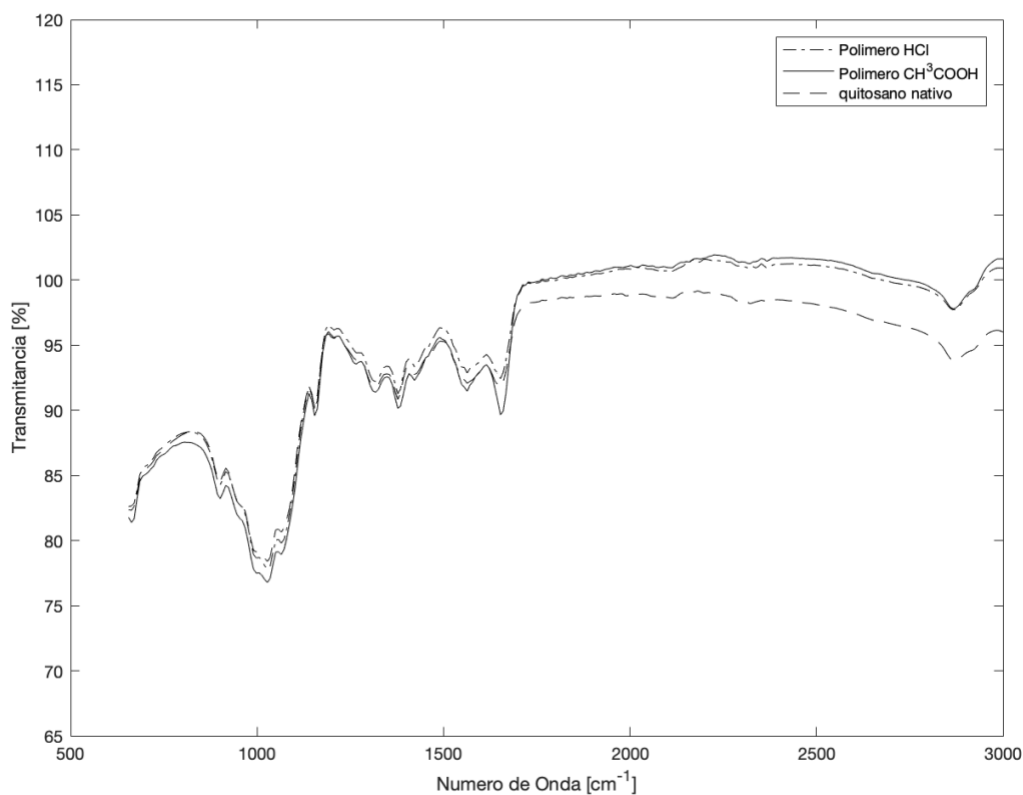


Figura 9. FTIR de la formación del polímero cuando se usa ácido acético y cuando se usa HCl. Se incluye el control negativo del quitosano nativo

## ANEXO C: FTIR DE HIDROGELES FORMADOS

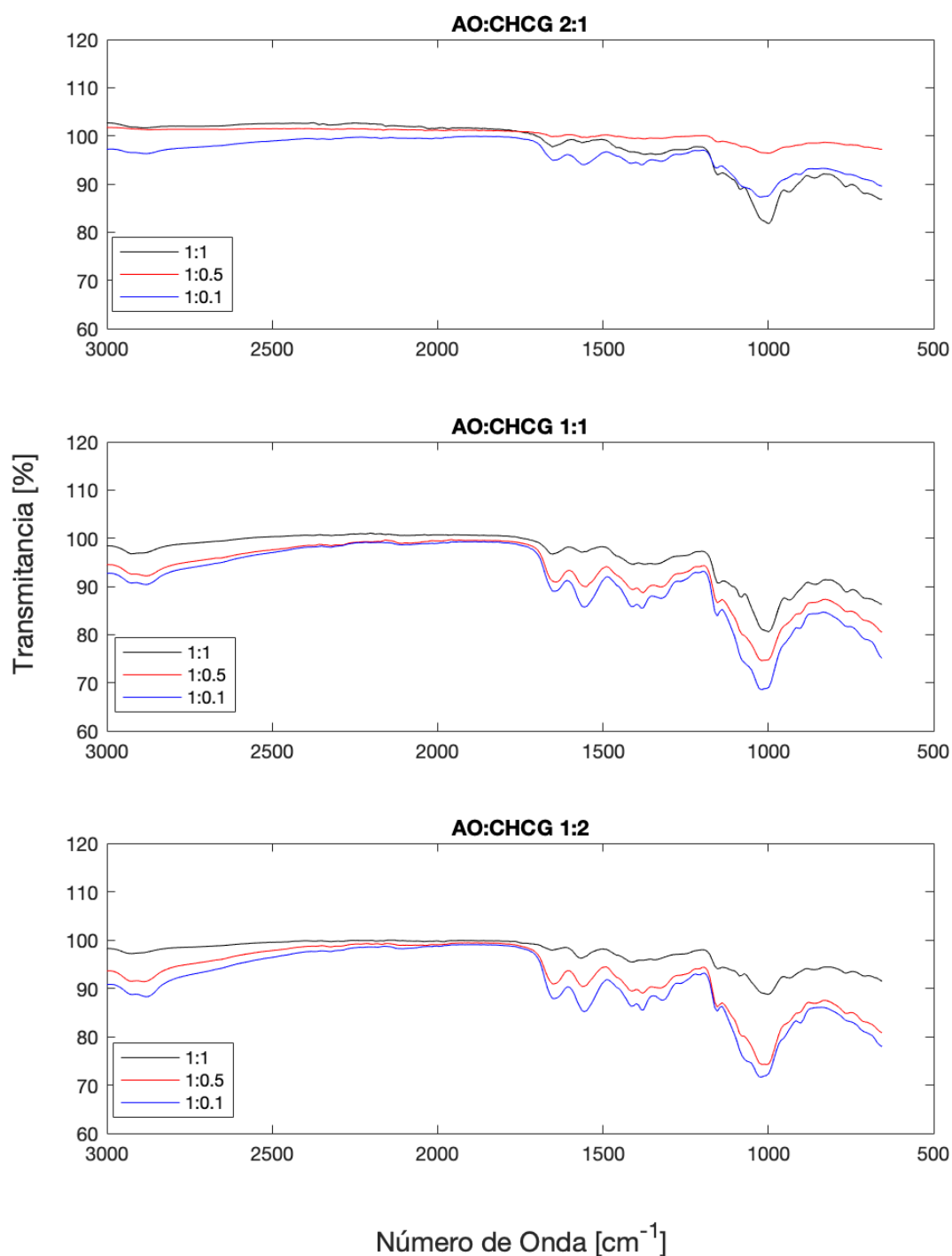


Figura 10. Conjunto de FTIR de todos los hidrogel formados con el método experimental. El título representa la relación AO-CHCG. En cada gráfico, se incluye la relación CH-CG de cada hidrogel

## ANEXO D: DATOS RECOPIADOS EN LA ETAPA DE HINCHAMIENTO

Tabla 5. Pesos en mg promediados de cada hidrogel durante el proceso de hinchamiento a lo largo de 72 horas.

	1A	2A	3A	1B	2B	3B	1C	2C	3C
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	122.8238	166.8890	108.1571	157.9259	207.9468	100.0533	112.8799	104.9625	105.2218
2	144.6729	139.9231	123.4851	138.6319	221.4948	118.8605	156.1875	146.7371	109.3299
3	166.6575	152.6224	113.5827	119.0108	268.6839	113.8977	101.4282	152.0671	108.0703
24	121.6636	174.9895	121.5413	159.1042	185.2475	108.9594	105.0916	131.9954	103.2732
48	108.1228	118.6385	101.0367	104.5290	197.1169	95.5719	91.4943	121.0821	81.9595
72	91.2027	125.5589	86.3004	134.5034	177.2822	119.0329	73.9499	91.4635	113.8736

Tabla 6. Tabla de desviaciones estándar calculadas a partir de los pesos no promediados de los hidrogeles.

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	40.7549	47.0780	48.8323	27.8391	141.7943	42.3748	42.1458	56.4727	46.7550
2	65.0383	52.6084	44.8151	16.5613	117.9594	54.4865	53.9273	100.5667	61.2790
3	29.0519	33.3725	55.6373	29.6382	88.7480	26.4464	24.6570	116.1484	51.9328
24	34.9567	88.6148	69.5507	38.4236	104.4002	24.3967	20.9598	64.7489	43.3332
48	33.4419	7.2757	70.0760	21.0215	54.6218	23.2220	29.8142	75.3883	33.4288
72	16.8674	13.5809	44.7239	15.3513	95.1891	29.4060	25.4589	51.4399	59.1153