

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

**Entrecruzamiento de biopolímeros mediante reacciones de
amidación y esterificación**

Diego Mateo Parra Jara

Ingeniería Química

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero Químico

Quito, 2 de mayo de 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Entrecruzamiento de biopolímeros mediante reacciones de amidación y
esterificación**

Diego Mateo Parra Jara

Nombre del profesor, Título académico

José Ramón Mora, PhD

Nombre del profesor, Título académico

Juan Diego Fonseca, PhD

Quito, 2 de mayo de 2023

© 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: Diego Mateo Parra Jara

Código: 00200073

Cédula de identidad: 0104932363

Lugar y fecha: Quito, 02 de mayo de 2023

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UNPUBLISHED DOCUMENT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 trabajo se estudia el entrecruzamiento químico mediante dos tipos de reacciones de almidón, pectina y quitosano para la formación de hidrogeles. A través de 3 diferentes procesos de funcionalización, se busca tener la esterificación y/o amidación de estos biopolímeros. El primer proceso se centró en la esterificación mediante alcoholes y ácido sulfúrico para lograr una funcionalización de la pectina. En el segundo, se usó como catalizador el cloruro de hierro (III) para obtener el entrecruzamiento entre la pectina y el quitosano, vía formación de grupos amida. Por último, con el uso de solventes eutécticos profundos se logró obtener una funcionalización tanto del quitosano como del almidón para posteriormente entrecruzarlos con almidón y quitosano sin tratar. Con el uso del equipo de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) se pudo observar si existe cambios o no en los grupos funcionales de los biopolímeros, donde se observan cambios sustanciales en los biopolímeros funcionalizados con el solvente eutéctico profundo (SEP). Finalmente se realizó pruebas de hinchamiento de los hidrogeles formados a partir del quitosano funcionalizado y almidón o quitosano puro, usando proporciones 1:1, 1:2 y 2:1 respectivamente, dándonos como resultado un hidrogel el cual tuvo proporciones 2:1 siendo más estable en comparación a los otros, esto confirma que se logró obtener un entrecruzamiento químico para la formación de hidrogeles.

Palabras clave: Hidrogel, amidación, esterificación, SEP, quitosano, pectina, almidón.

ABSTRACT

In the present work, the chemical cross-linking is studied through two types of reactions that are, esterification and amidation of natural biopolymers such as starch, pectin, and chitosan for the formation of hydrogels. Through 3 different processes, it is sought to have these chemical interactions with techniques already reported, such as esterification. Esterification through alcohols and sulfuric acid is used to achieve a functionalization of the pectin. Also with the use of catalysts such as iron chloride to obtain cross-linking between pectin and chitosan through their amino groups thanks to the catalyst. Finally, with the use of deep eutectic solvents, it is possible to obtain treatment or functionalization of both chitosan and starch to later be able to cross-link them between starch and untreated chitosan, through acetic acid. With the use of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) equipment, it can be observed whether or not there are changes in the existing functional groups in the biopolymers, where substantial changes are observed in the biopolymers treated with the deep eutectic solvent (SEP). Finally, swelling tests of the hydrogels formed from the functionalized chitosan and starch or pure chitosan are carried out using proportions 1:1, 1:2, and 2:1 of the functionalized chitosan (QUR) and the untreated biopolymer, giving us as a result a hydrogel which has very stable 1:1 ratios compared to the others, this confirms that it was possible to obtain a chemical crosslinking for the formation of hydrogels.

Key words: Hydrogel, amidation, esterification, DES, chitosan, pectin, starch.

TABLA DE CONTENIDO

1.	Introducción	11
2.	Metodología	13
2.1	Preparación del medio para el entrecruzamiento	13
2.1.1.	Esterificación de la pectina por medio de metanol, hexano y ácido sulfúrico.....	13
2.1.2.	Entrecruzamiento químico entre la pectina y quitosano mediante el uso de cloruro de hierro hexahidratado.....	13
2.1.3.	Entrecruzamiento a través a del solvente eutéctico profundo (SEP) compuesto por cloruro de colina y urea.	14
2.1.4.	Formulación y caracterización de hidrogeles	14
2.2	Análisis FTIR.....	14
2.3	Prueba de hinchamiento.....	15
3.	Resultados y discusiones.....	16
3.1	Esterificación de biopolímero por metanol, hexano y ácido sulfúrico	16
3.2	Amidación mediante el uso de cloruro de hierro hexahidratado como catalizador para el entrecruzamiento entre la pectina y el quitosano.....	16
3.2.1	Análisis FTIR	16
3.3	Entrecruzamiento químico mediante solvente eutéctico profundo.....	22
3.3.1.	Análisis FTIR.....	22
3.3.2.	Hidrogeles de quitosano funcionalizado.....	24
3.3.3.	Análisis FTIR.....	24
3.3.4.	Pruebas de hinchamiento.....	27
4.	Conclusiones.....	30
5.	Referencias bibliográficas	32

Anexo A: Analisis ANOVA.....	36
5.1 Hinchamiento hidrogeles QUR:QUI.....	36
5.2 Hinchamiento hidrogeles QUR:ALM.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formulaciones de los hidrogeles elaborados con ácido acético, QUR: quitosano y

QUR: almidón. 14

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espectro IR de la pectina.....	18
Figura 2. Espectro IR del quitosano.....	18
Figura 3. Espectro IR de mezcla entre pectina y quitosano.	19
Figura 4. Espectro IR de mezcla pectina-quitosano con cloruro de hierro al 1%.....	19
Figura 5. Espectro IR de mezcla pectina-quitosano con cloruro de hierro al 3%.....	20
Figura 6. Espectro IR de mezcla pectina-quitosano con cloruro de hierro al 5%.....	20
Figura 7. Espectro IR de mezcla pectina-quitosano con cloruro de hierro al 7%.....	21
Figura 8. Espectro IR de mezcla pectina-quitosano con cloruro de hierro al 10%.....	21
Figura 9. Control Urea	23
Figura 10. Quitosano funcionalizado.....	23
Figura 11. Espectros FTIR de a) Quitosano funcionalizado b) Quitosano c) Urea.....	24
Figura 12. Espectros FTIR de los hidrogeles a distintas proporciones a) control b) QUR:QUIT 1:1 c) QUR:QUIT 1:2 b) QUR:QUIT 2:1.....	25
Figura 13. Espectro FTIR de hidrogeles formados de QUR:QUIT a diferentes proporciones.	26
Figura 14. Espectros FTIR de los hidrogeles conformados por QUR y almidón a diferentes proporciones a) Control b) QUR:ALM 1:1 c) QUR:ALM 1:2 d) QUR:ALM 2:1	26
Figura 15. Espectro FTIR de hidrogeles formados por QUR:ALM a diferentes proporciones	27
Figura 16. Graficas de hinchamiento de hidrogeles QUR:QUI a proporciones 1:1, 2:1 y 1:2.	28
Figura 17. Graficas de hinchamiento de hidrogeles QUR:ALM a proporciones 1:1, 2:1 y 1:2.	29

1. INTRODUCCIÓN

Los hidrogeles son materiales conformados por redes de polímeros a partir del entrecruzamiento de materiales, gracias a estas redes poliméricas se forman estructuras capaces de hincharse y de retener un porcentaje alto de agua en su interior [1]. Este tipo de materiales han sido de gran interés para algunas industrias principalmente en la farmacéutica y biomédica; En éstas los hidrogeles tienen varias aplicaciones entre las cuales podemos destacar las formulaciones de sistemas de liberación controlada, parches transdérmicos, reparación de tejidos humanos, entre otros[2],[3]. Para cada una de sus aplicaciones los hidrogeles deben tener ciertas propiedades, así como también ciertos materiales para que se adapten de mejor manera a su uso y obtener un desempeño óptimo del mismo.

Como ya se mencionó los hidrogeles tienen una gran capacidad de retención de líquidos en su estructura debido a que hay presencia de algunos grupos funcionales que tienen afinidad con el agua [4], esto provoca que el hidrogel sea como una esponja capaz de absorber líquidos y aumentar su tamaño, esta propiedad mecánica favorece a la liberación de fármacos para poder controlar la velocidad a la que es suministrado [5]. Este tipo de propiedades pueden variar dependiendo de la estructura y de los materiales usados para formular los hidrogeles.

Los materiales que se usan para obtener hidrogeles son polímeros ya sean sintéticos o naturales[6],[7]. Entre los polímeros sintéticos está el ácido poliláctico (PLA), poliéster uretano (PU) [8], entre otros. Los cuales permiten que los hidrogeles que se forman tengan mejores propiedades mecánicas donde la absorción e hinchamiento son mayores. Actualmente se trata de suplir estos polímeros sintéticos con polímeros de origen natural o biopolímeros, como el almidón, la pectina y el quitosano. El almidón es un polisacárido que está compuesto por amilasas y amilopectinas, se los extrae principalmente de cereales o tubérculos. La pectina es otro tipo de polisacárido que contiene ácido galacturónico y se encuentra en las paredes

celulares de las plantas, así como en las cáscaras de ciertas frutas. Por último, el quitosano también es un polisacárido que está constituido por N-glucosamina y N-acetil glucosamina la cual se obtiene a partir de la desacetilación de la quitina contenida en los exoesqueletos de algunos crustáceos, como por ejemplo el camarón [9]. Si bien estos biopolímeros tienen propiedades antibacteriales y son biocompatibles con el cuerpo humano [10], el quitosano presenta baja afinidad con el agua y solventes orgánicos, esto resulta un problema al usarse para liberaciones de compuestos ya que su fuerza mecánica se ve afectada y en consecuencia no se obtiene una liberación controlada [11]; por esto se buscan nuevas alternativas de entrecruzamiento de materiales para formar uno más fuerte y estable con el uso de biopolímeros a través de diferentes métodos experimentales[12].

Estudios demuestran que se ha logrado sintetizar hidrogeles a través de pectina amidada y quitosano oxidado, donde gracias a la interacción de los grupos amina y aldehído se obtuvo el entrecruzamiento químico para formar hidrogeles que ayudarán a la regeneración de piel en heridas causadas por quemaduras[13]. También se reportan hidrogeles formados a partir de quitosano y almidón que con diferentes proporciones de biopolímero se logra la liberación controlada de herbicidas como la antrazina [14].

Los hidrogeles tienen diversas aplicaciones y métodos de formulación, existen varias vías de formación de hidrogeles que necesitan ser estudiadas, por lo que, en el presente proyecto de investigación se estudia el entrecruzamiento químico de biopolímeros mediante reacciones de amidación y esterificación a través de tres metodologías para la esterificación y amidación de biopolímeros, los cuales son la pectina, el almidón y el quitosano.

2. METODOLOGIA.

2.1 Preparación del medio para el entrecruzamiento

2.1.1. Esterificación de la pectina por medio de metanol, hexano y ácido sulfúrico.

Para la esterificación de la pectina se siguió el protocolo de uso de alcoholes y ácido sulfúrico [15]. Se agregó 1% m/v de pectina en 10 ml de metanol con ácido sulfúrico al 0.1 M, a esta solución se la dejó reposar por 2 horas con agitación. Una vez finalizado éste tiempo se procedió a lavar la solución con metanol 4 veces.

Se usó otro método de esterificación mediante alcoholes propuesto por Rogozinski et al[16] . Se agregó 1% m/v de pectina en 2 ml de metanol, se agitó constantemente con un agitador magnético y se añadió gota a gota 0.5 ml de ácido sulfúrico, luego, se procedió a calentar la solución hasta el punto de ebullición y de manera inmediata se dejó enfriar a temperatura ambiente. Finalmente se añadió 2ml de hexano y 2ml de agua provocando una separación de fases.

2.1.2. Entrecruzamiento químico entre la pectina y quitosano mediante el uso de cloruro de hierro hexahidratado.

Para la amidación de la pectina y el quitosano se usó como base el protocolo de Mkhonazi [17]. Se agregó 1% m/v de quitosano y de pectina en el mismo porcentaje en 10 ml del solvente y 0,1% m/v de cloruro de hierro hexahidratado como catalizador con respecto a la pectina. Se utilizó cuatro solventes: agua, acetonitrilo, etanol y metanol. Cada solución se sometió a una temperatura de 50°C por un tiempo de 2 horas con agitación. Posterior al tiempo se filtró cada muestra y se dejó secar durante 2 horas; al observar que el agua es un mejor solvente, se procedió a dejar fijo el solvente y solo se modificaron las cantidades del catalizador utilizado y se agregó cloruro de hierro 1%, 3%, 5%, 7% y 10% m/m respecto a la pectina.

2.1.3. Entrecruzamiento a través a del solvente eutéctico profundo (SEP) compuesto por cloruro de colina y urea.

Para la elaboración del solvente eutéctico profundo se usó el método reportado por Abbott [18]; es decir, se añadió cloruro de colina y urea en relación 1:2 respectivamente, en un vaso de precipitación, se sometió a una temperatura a 65°C hasta que se vuelva líquido. Finalmente, al tener el solvente completamente líquido, se agregó el quitosano al 1% m/v y se lo dejó en agitación por un período de 2 horas.

2.1.4. Formulación y caracterización de hidrogeles

En una solución de ácido acético (AAC) al 1,5% v/v se agregó el quitosano funcionalizado (QUR) al 4% m/v en agitación constante, luego que ocurrió la mezcla se agregó de manera paulatina quitosano puro. Las proporciones de QUR/quitosano o QUR/almidón fueron de 1:1, 1:2, 2:1. Luego de tener la mezcla de los biopolimeros se procedió a trasladarlos a un recipiente para su secado durante 24 horas.

Tabla 1. Formulaciones de los hidrogeles elaborados con ácido acético, QUR:quitosano y QUR:almidón.

% AAC*/QUR:Qt**	1:1	2:1	1:2
4%	(QUR.Qt)	(QUR.Qt)	(QUR.Qt)
4%	(QUR.ALM)	(QUR.ALM)	(QUR.ALM)

*Porcentaje de ácido acético.

**Proporción de QUR:ALM.

2.2 Análisis FTIR

Se realizaron análisis de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) para caracterizar los materiales en el equipo Agilent Carey 630. Los espectros se tomaron en una región desde 600-4000 cm⁻¹.

2.3 Prueba de hinchamiento

Para las pruebas de hinchamiento se colocó los hidrogeles secos en una solución buffer salina con fosfato (PBS) a un pH de 7.38 y una temperatura de 37°C en incubación por un período de 72 horas. Se pesaron los hidrogeles previamente secados para tener su peso inicial, luego de esto se fueron pesando paulatinamente en tiempos de: media, una, dos, tres, cuatro, cinco, veinte y cuatro, cuarenta y ocho, y setenta y dos horas. El porcentaje de hinchamiento se determinó mediante la formula:

$$\%H = \frac{P_t - P_0}{P_0} \times 100$$

Donde P_0 es la masa inicial y P_t es la masa del hidrogel en un tiempo t .

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Esterificación de biopolímero por metanol, hexano y ácido sulfúrico

Lo que se busca hacer a través de esta metodología es esterificar los grupos ácidos carboxílicos presentes en la pectina, a través del método tradicional de mezclar ácidos carboxílicos y alcoholes en presencia de ácido sulfúrico[19]; en el cual, al estar ausentes los grupos de ácidos carboxílicos de la pectina se evita la posibilidad de una reacción ácido-base con el quitosano y al tener solo grupos ésteres, la hipótesis pretendía que exista un entrecruzamiento con el quitosano mediante un ataque nucleofílico de acilo por parte del grupo amino del quitosano; sin embargo, el problema que surgió es que la pectina se degradó debido a la temperatura y al medio ácido [20], esto se presume ser resultado de la ruptura de los enlaces acetales que están presentes en la estructura de la pectina, por lo que, este primer intento no es favorable para el entrecruzamiento entre la pectina y el quitosano.

3.2 Amidación mediante el uso de cloruro de hierro hexahidratado como catalizador para el entrecruzamiento entre la pectina y el quitosano.

Lo que se propuso es que mediante el catalizador de cloruro de hierro (III) se pueda formar una amida mediante los grupos funcionales ésteres disponibles en la pectina y la amina del quitosano, inhibiendo el proceso de la reacción ácido-base[17]. Concluida la reacción se obtuvo como resultado un material que pudo ser un potencial hidrogel, por lo que se obtuvieron los espectros FTIR de los materiales formados a diferentes concentraciones de catalizador y comparados con sus respectivos controles.

3.2.1 Análisis FTIR

En primer lugar, se hizo un espectro FTIR solo de la pectina, quitosano, y de la mezcla pectina-quitosano los cuales fueron utilizados como control para los procesos de funcionalización. Los grupos funcionales presentes de la pectina (Figura 1) son principalmente

el grupo carbonilo C=O de los ácidos carboxílicos y los ésteres, estos grupos aparecen a una longitud de onda alrededor de 1740 cm^{-1} [21].

Por otro lado, tenemos a la molécula del quitosano en su FTIR se observó una banda en la Figura 2 a una longitud de onda de 1650 cm^{-1} característica del grupo carbonilo presente en las amidas I [22], y otra alrededor de 1560 cm^{-1} que indica la presencia de grupos amino. Por último, se obtuvo el FTIR del control que fue la mezcla de ambos biopolímeros (pectina+quitosano) (Figura 3) donde se observó una similitud en las longitudes de onda pertenecientes al grupo carbonilo de la pectina y el quitosano por lo que puede existir un solapamiento de las mismas[23].

Finalmente se obtuvo los espectros IR relacionados a la cantidad cloruro de hierro usado para la reacción, donde se pudo apreciar en las Figura 4 hasta la Figura 8 que las bandas de grupos carbonilo y amino no tuvieron un cambio sustancial, siguen iguales a los espectros del control de la mezcla de los dos biopolímeros, lo que indica que el cloruro de hierro no ayuda a la amidación de los grupos carboxilo presentes en la pectina como se esperaba, sin tener un entrecruzamiento con el quitosano. La hipótesis basada en el estudio de D. Mkhonazi[17], indica que los grupos ésteres tienen una amidación directa la cual es catalizada por el cloruro de hierro; sin embargo, para la formación de hidrogeles a partir este método resultó fallido.

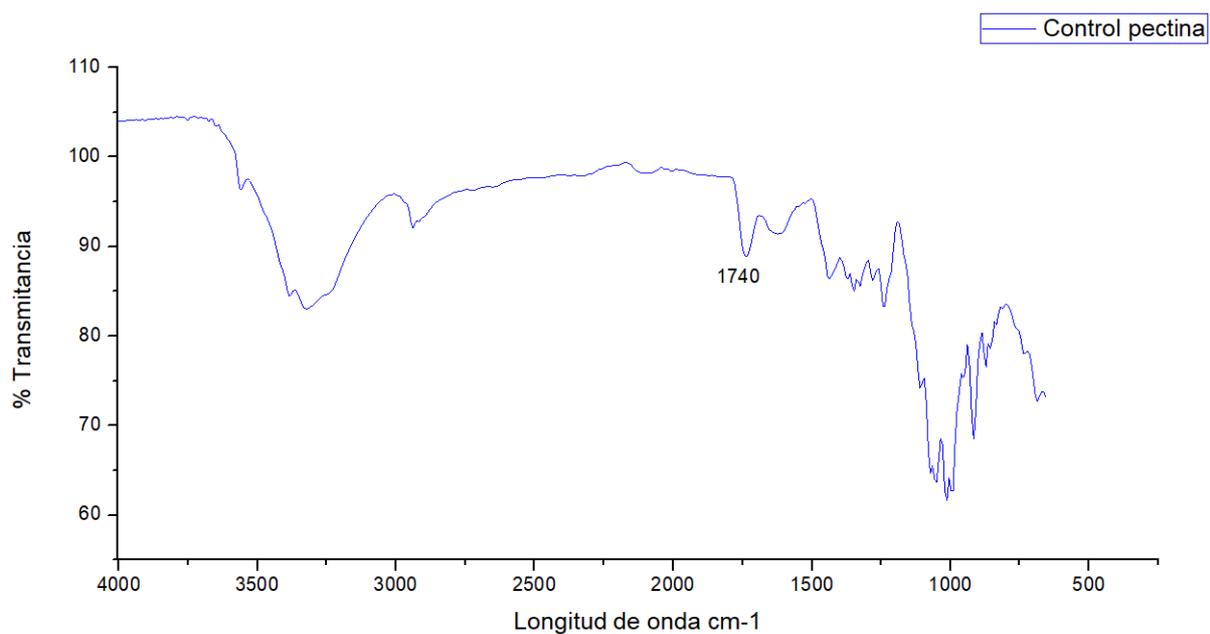


Figura 1. Espectro IR de la pectina

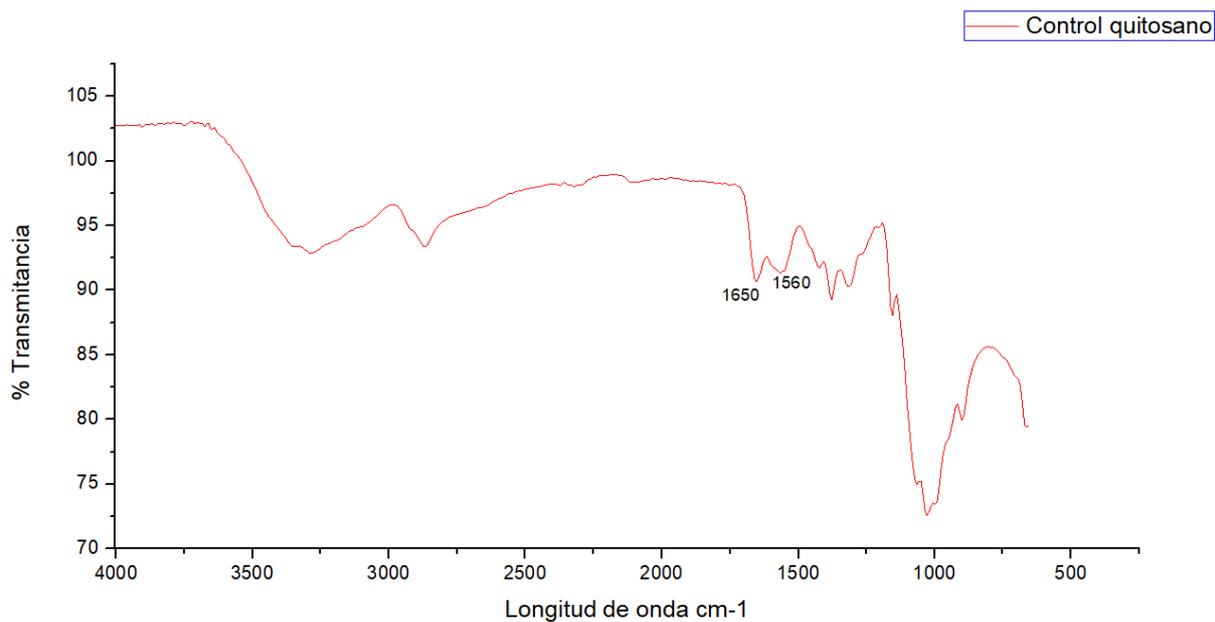


Figura 2. Espectro IR del quitosano

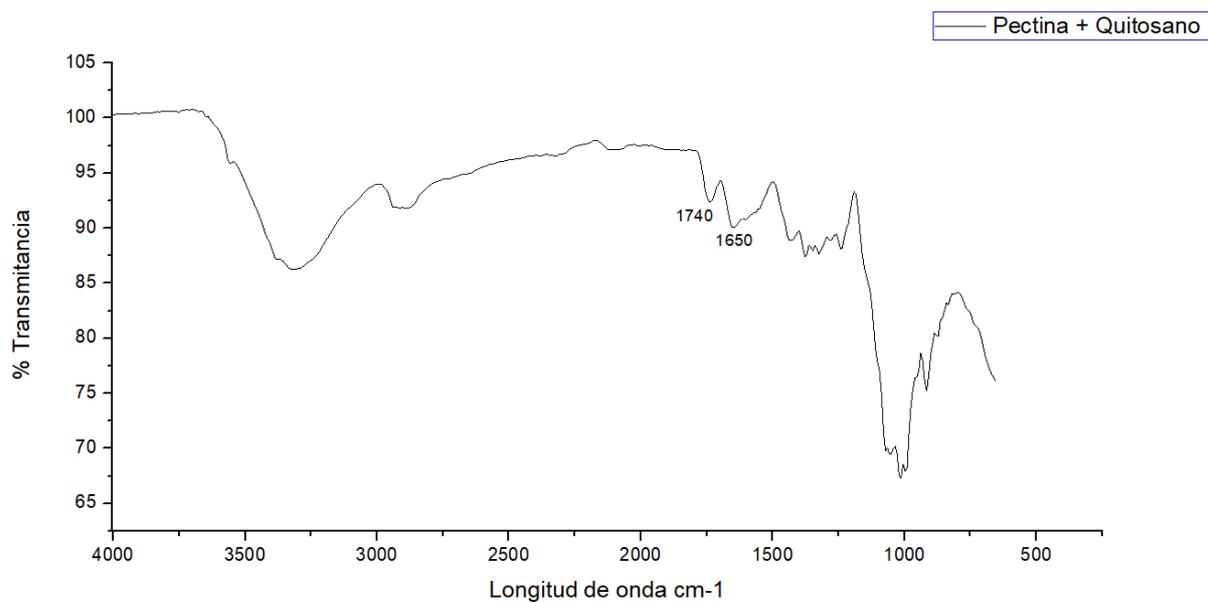


Figura 3. Espectro IR de mezcla entre pectina y quitosano.

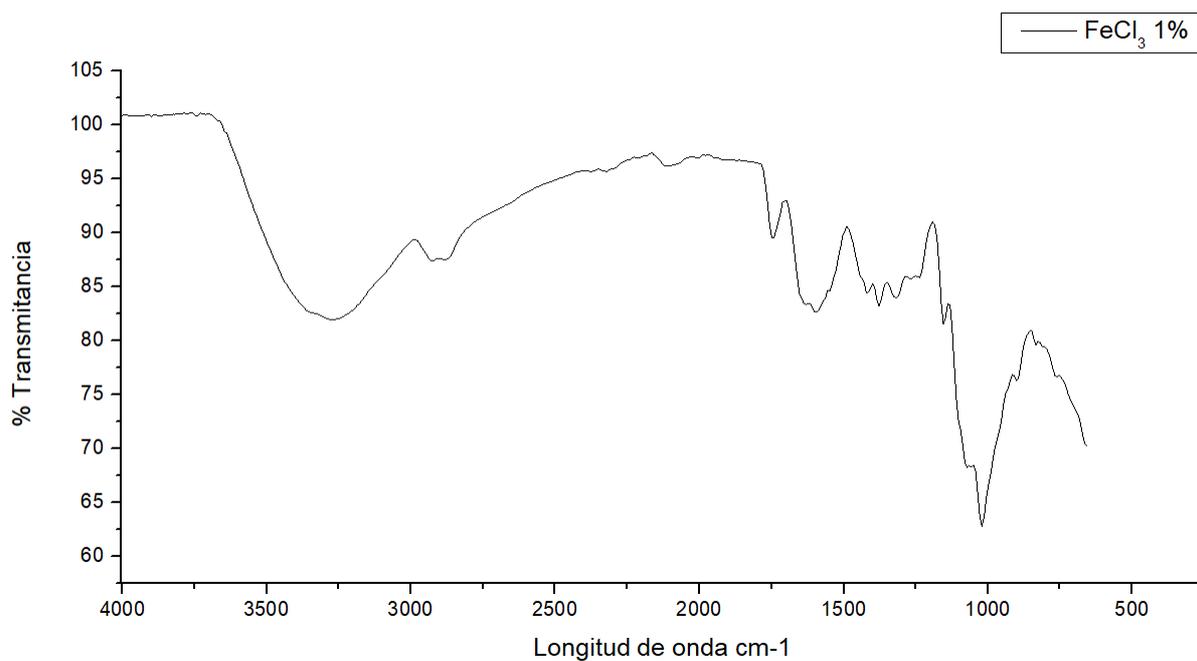


Figura 4. Espectro IR de mezcla pectina-quitosano con cloruro de hierro al 1%

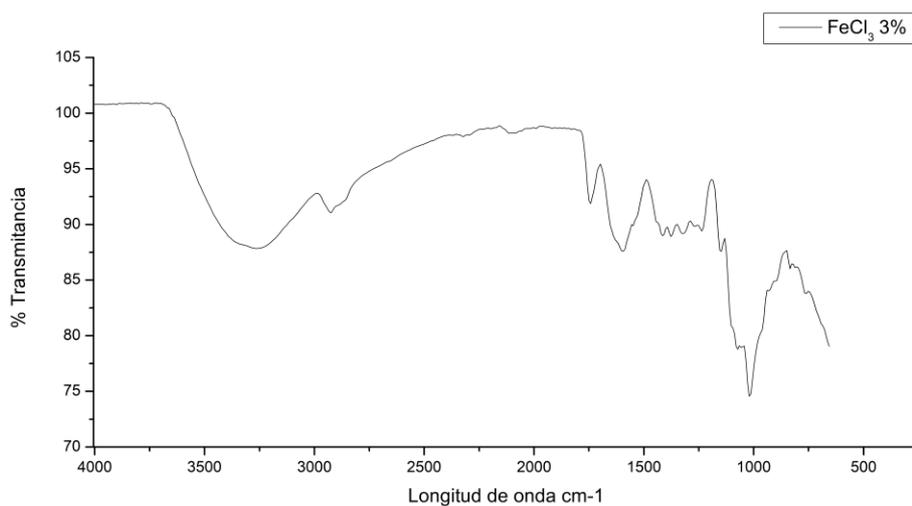


Figura 5. Espectro IR de mezcla pectina-quitosano con cloruro de hierro al 3%.

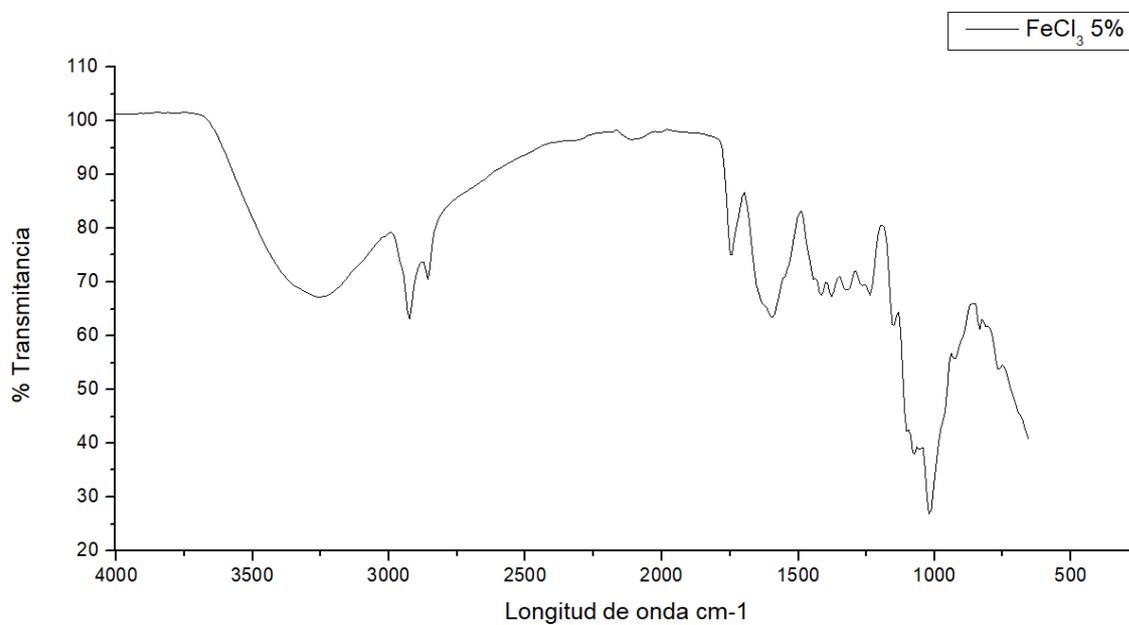


Figura 6. Espectro IR de mezcla pectina-quitosano con cloruro de hierro al 5%.

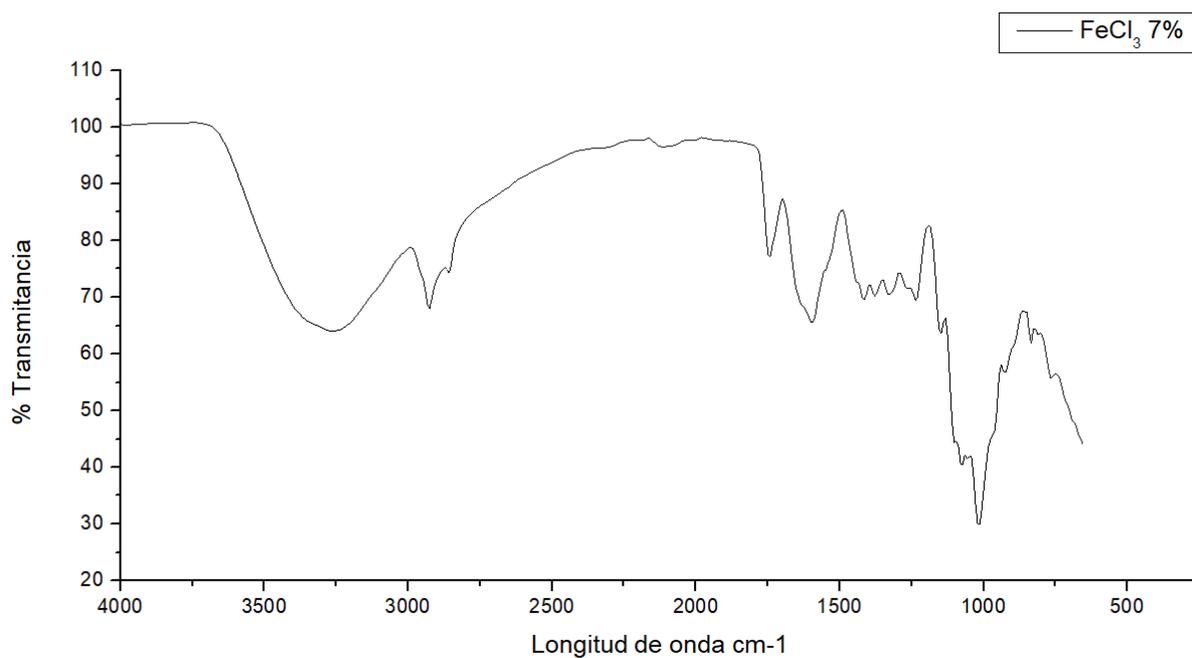


Figura 7. Espectro IR de mezcla pectina-quitosano con cloruro de hierro al 7%

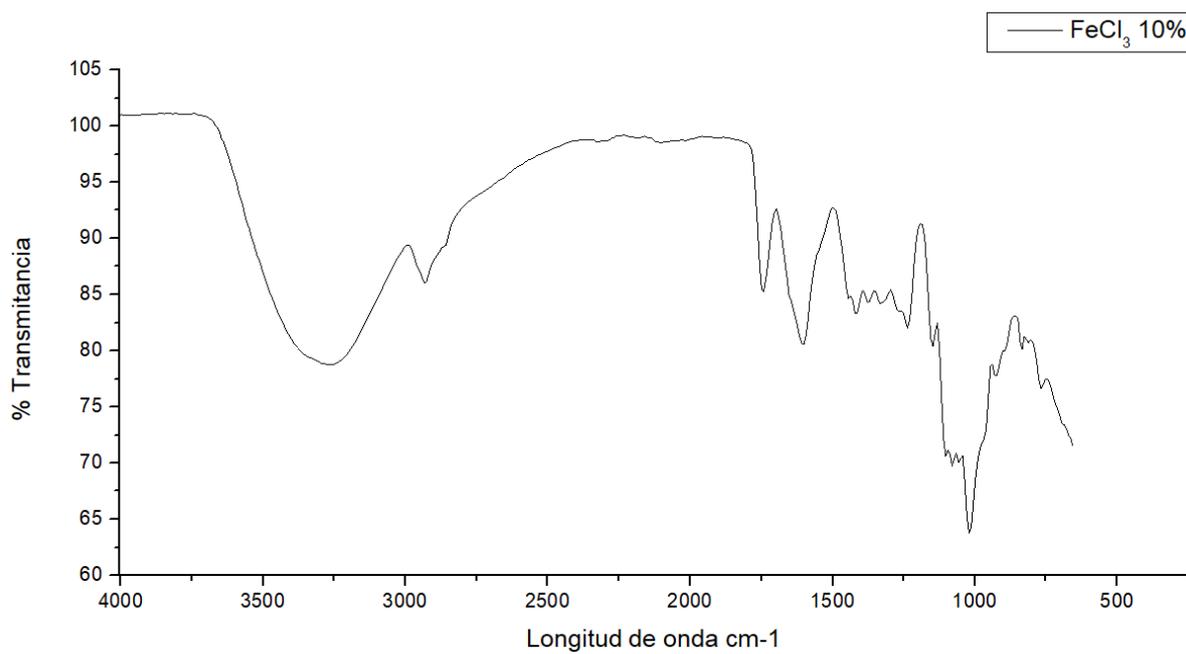


Figura 8. Espectro IR de mezcla pectina-quitosano con cloruro de hierro al 10%

3.3 Entrecruzamiento químico mediante solvente eutéctico profundo.

Se realizó el solvente eutéctico profundo (SEP) mediante el método de Abbott [18], donde se pudo apreciar el cambio de estado sólido a líquido, y este se mantuvo en estado líquido a temperatura ambiente; es decir, que está en su punto eutéctico. A través de la urea que se encuentra en el SEP se espera que existan reacciones con el grupo amino presentes en el quitosano. A partir de la funcionalización del biopolímero, que en este caso es el quitosano, se realizó un espectro IR del quitosano funcionalizado y se continuó con la elaboración de los hidrogeles por el método mencionado.

3.3.1. Análisis FTIR

Como primer paso para poder observar una diferencia entre el quitosano puro y el quitosano funcionalizado se realizó el espectro IR de los controles; es decir, un espectro IR del quitosano y un espectro IR de la Urea representados en la Figura 2 y Figura 9 respectivamente para poder compararlos con el quitosano funcionalizado (QUR) de la Figura 10 por el SEP. Se puede observar las bandas principales del quitosano que se encuentran a una longitud de onda de 1650 cm^{-1} y 1560 cm^{-1} , estos son pertenecientes a los grupos carbonilo C=O y amino N-H respectivamente [24]. En el control de la urea se puede observar en las bandas 1461 cm^{-1} y 1692 cm^{-1} pertenecientes a los grupos amino y la banda de 1682 cm^{-1} pertenecientes al grupo carbonilo de la urea[25]. Por último tenemos el espectro IR del quitosano funcionalizado, que como se puede observar en la Figura 11 existe un cambio sustancial en el crecimiento de las bandas en 1550 cm^{-1} y 1650 cm^{-1} del quitosano funcionalizado (QUR) comparado con el quitosano puro, estas bandas pertenecientes al grupo amino y carbonilo son mucho más intensas que en el quitosano puro.

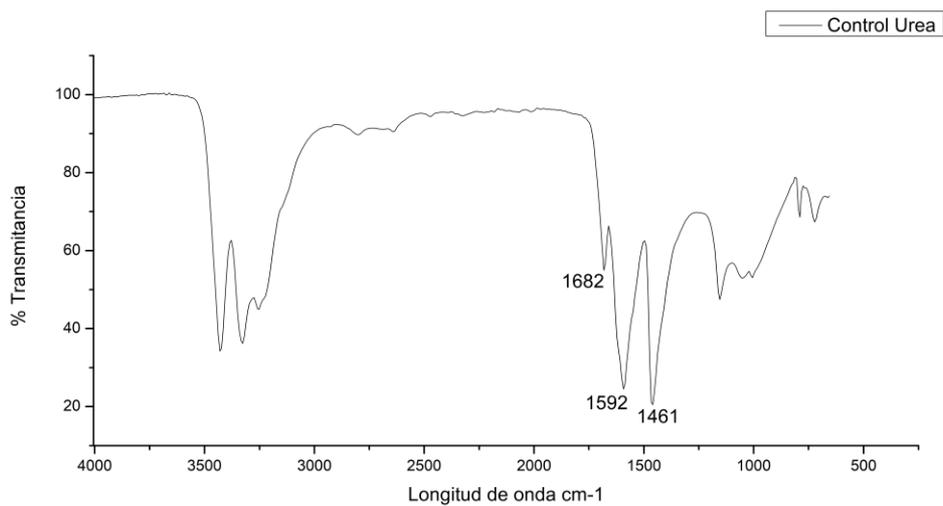


Figura 9. Control Urea

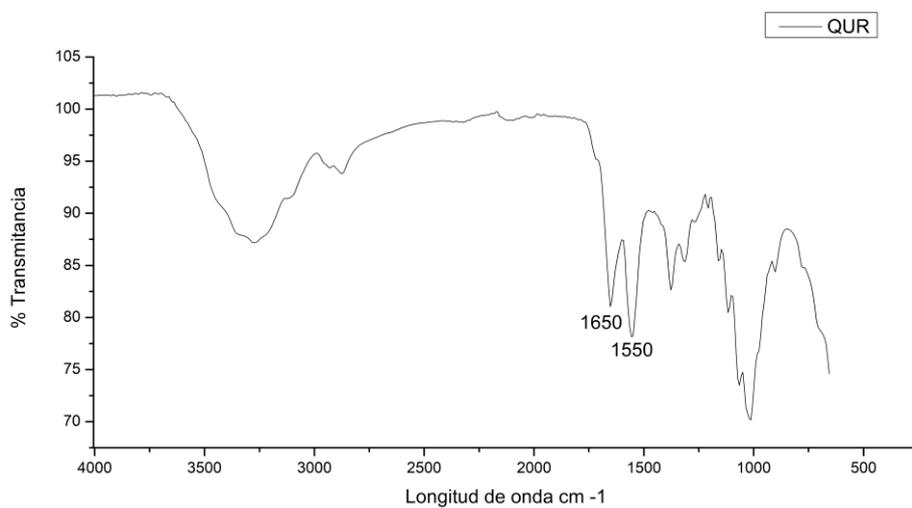


Figura 10. Quitosano funcionalizado.

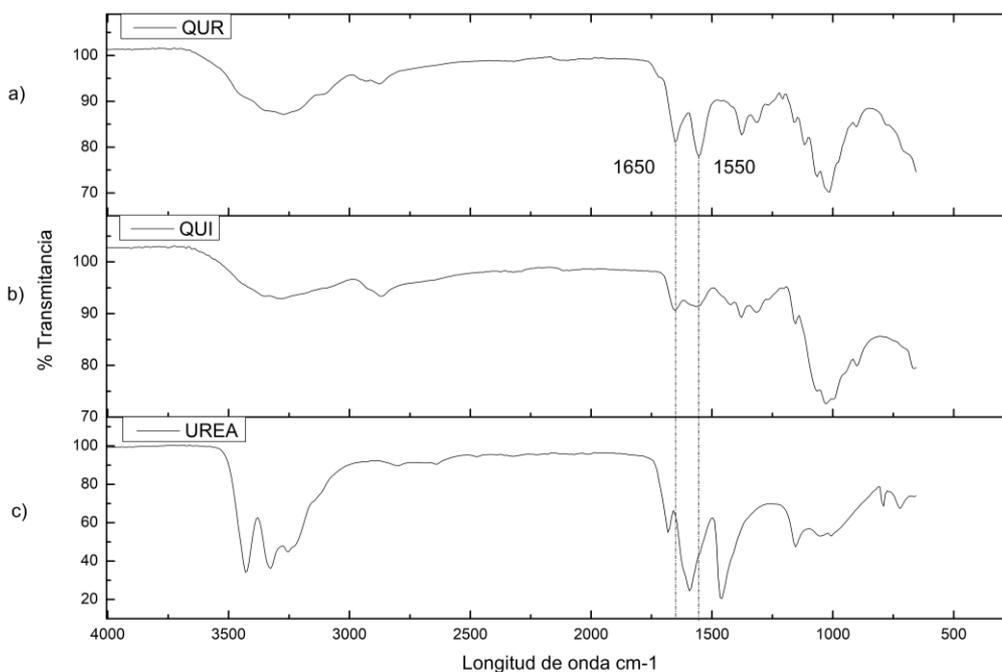


Figura 11. Espectros FTIR de a) Quitosano funcionalizado b) Quitosano c) Urea

3.3.2. Hidrogeles de quitosano funcionalizado

Se elaboraron los hidrogeles a partir del QUR, AAC y quitosano o almidón a través del protocolo propuesto. Para observar que cambios existen al momento del entrecruzamiento de los biopolímeros, se realizó espectroscopia IR de los materiales formados y para probar su capacidad de retener líquidos se realizó las respectivas pruebas de hinchamiento [26].

3.3.3. Análisis FTIR

A través de las gráficas del FTIR se notó los cambios que existen en las bandas como se observa en las Figura 12 y Figura 13 , a partir del control del material formado entre quitosano y ácido acético, se observó que las bandas que más sufren cambios son las que están en una longitud de onda de 1550 cm⁻¹ y ~1650 cm⁻¹ las cuales son pertenecientes al grupo amino NH y carbonilo de las amidas C=O, estas bandas aumentan o se intensifican dependiendo de la proporción que se agregue el QUR y el quitosano. También mostró una variación en la región entre 3000 cm⁻¹ y 2750 cm⁻¹, estas bandas que están a ~2900 cm⁻¹ y

$\sim 2800\text{ cm}^{-1}$ pertenecen a una tensión de los grupos OH de los ácidos carboxílicos debido al medio ácido al que se somete el QUR [27].

Para los hidrogeles formados con QUR y almidón (Figura 14) las bandas que sufren cambios son igualmente las del grupo amino y carbonilo de las amidas, mediante la Figura 15 se observó que las bandas cambian a menos que el QUR este con igual o mayor proporción al almidón, ya que al tener una proporción menor de QUR, no existió un cambio sustancial comparado con el control.

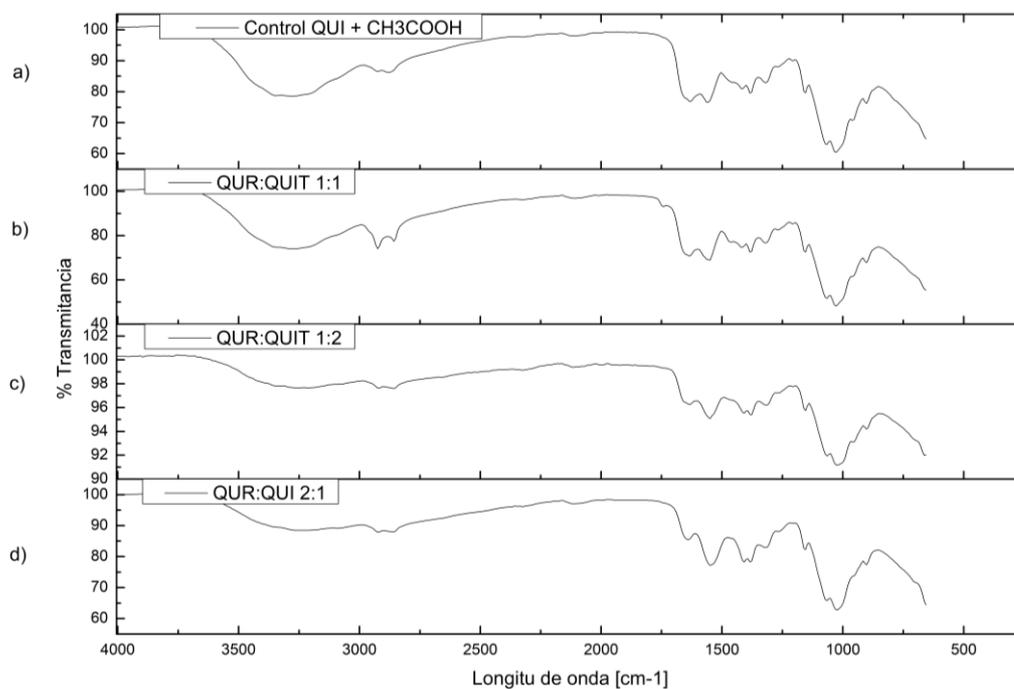


Figura 12. Espectros FTIR de los hidrogeles a distintas proporciones a) control b) QUR:QUIT 1:1 c) QUR:QUIT 1:2 b) QUR:QUIT 2:1

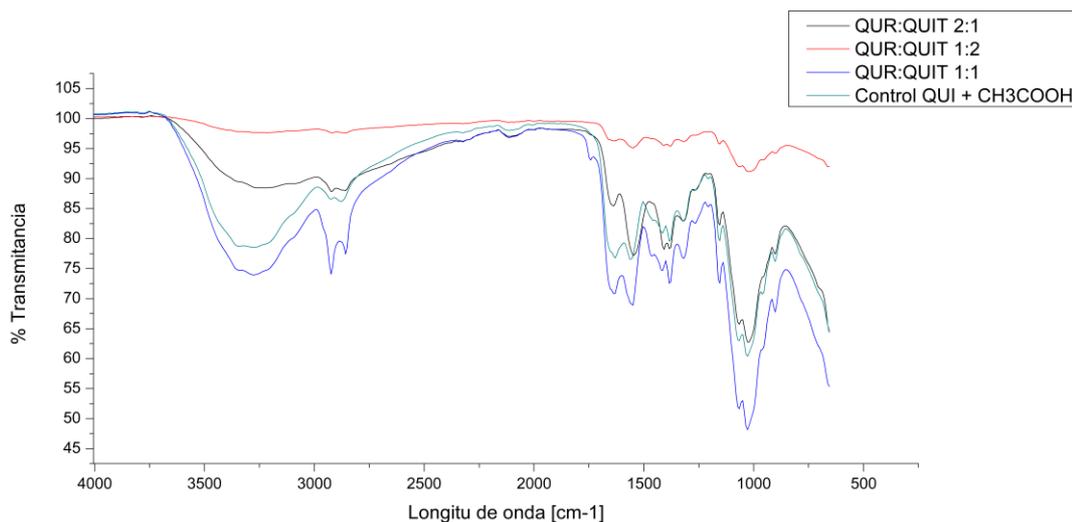


Figura 13. Espectro FTIR de hidrogeles formados de QUR:QUIT a diferentes proporciones.

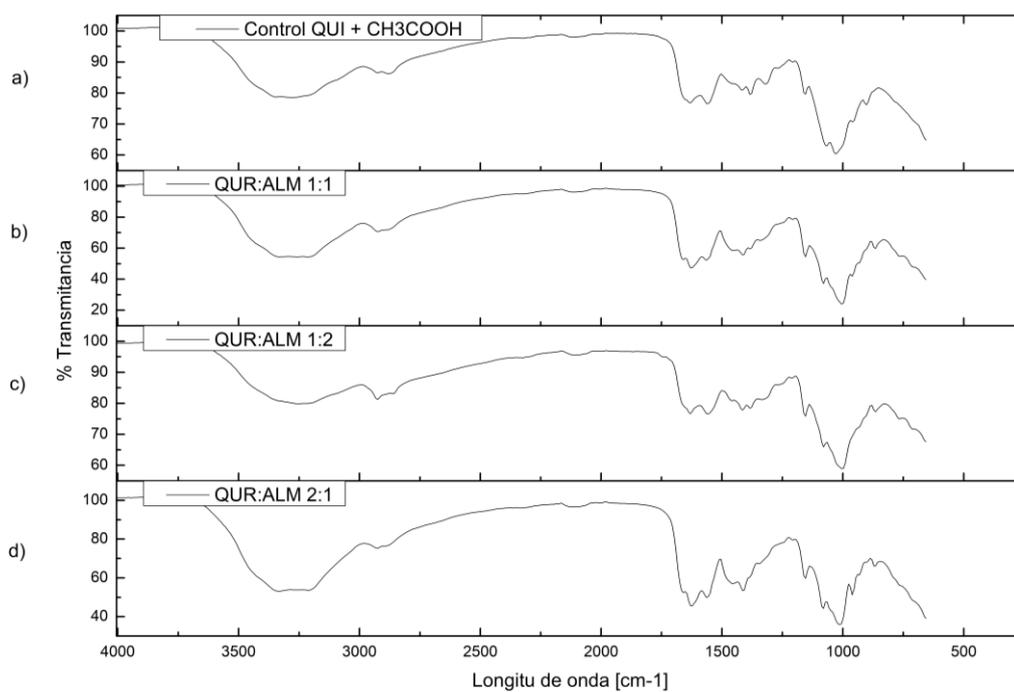


Figura 14. Espectros FTIR de los hidrogeles conformados por QUR y almidón a diferentes proporciones a) Control b) QUR:ALM 1:1 c) QUR:ALM 1:2 d) QUR:ALM 2:1

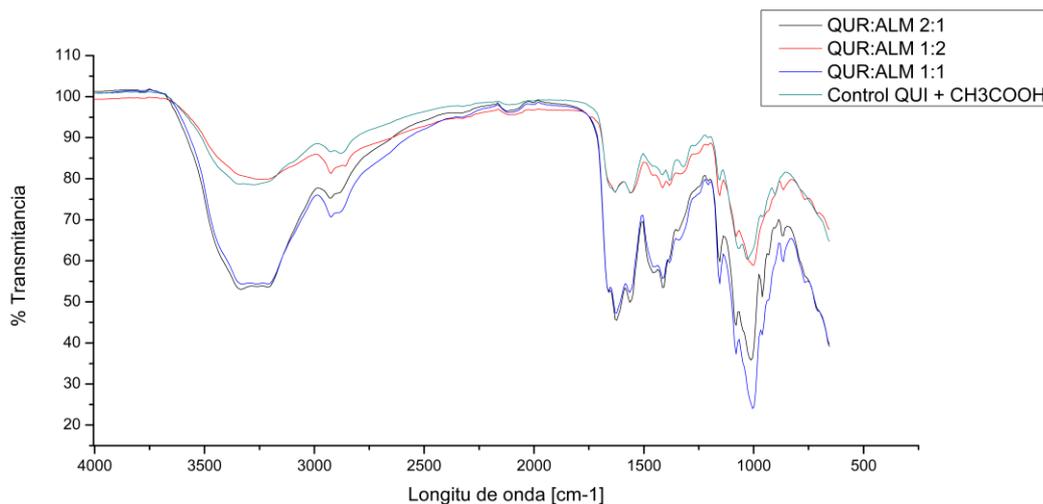


Figura 15. Espectro FTIR de hidrogeles formados por QUR:ALM a diferentes proporciones

3.3.4. Pruebas de hinchamiento

Para los hidrogeles formados a partir del quitosano funcionalizado se determinó que el tiempo y la composición de estos tienen un efecto significativo en su grado de hinchamiento y sobretodo en su durabilidad. Se observó una gran diferencia en la durabilidad entre los hidrogeles formados por QUR: QUI y QUR:ALM, los primeros si bien muestran cierto grado de desintegración debido al decrecimiento del hidrogel; sin embargo, lograron permanecer sin desintegrarse por completo hasta las 72 horas establecidas, mientras que los segundos su máxima duración fue de 24 horas y algunos se degradaron a partir de las 2 horas.

En la Figura 16 se puede observar que en la proporción 2:1 del hidrogel de QUR:QUI tiene una capacidad de hinchamiento superior; sin embargo, su porcentaje de hinchamiento a partir de las 48 horas va disminuyendo, pero no es muy significativo, lo que indica que este hidrogel tiene una excelente capacidad de hinchamiento y esto a su vez nos revela que a esta proporción el hidrogel es significativamente diferente; sin embargo, no se debe descartar que los hidrogeles de QUR:QUI en proporciones 1:1 y 1:2, ya que se observa que mantienen una estabilidad en el tiempo.

En la Figura 17 se observa que los hidrogeles formados por QUR:ALM tienden a degradarse muy pronto a comparación con los hidrogeles de QUR:QUI, por lo que su durabilidad y estabilidad no son buenas, esto pudo ser debido a que el almidón en presencia del ácido acético puede degradarse y como consecuencia aumenta la solubilidad en medios acuosos por lo que reduce su capacidad de hinchamiento[28]. Las diferencias que existen entre la variación de la proporción y el porcentaje de hinchamiento según el análisis estadístico son significantes, esto debido a que estos hidrogeles pueden durar 24 horas o 2 horas, dependiendo de la proporción del hidrogel.

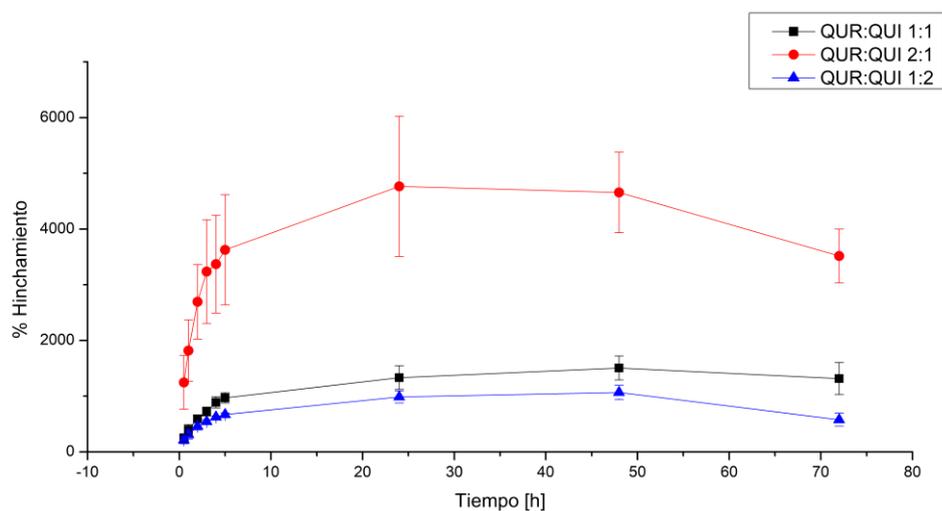


Figura 16. Graficas de hinchamiento de hidrogeles QUR:QUI a proporciones 1:1, 2:1 y 1:2.

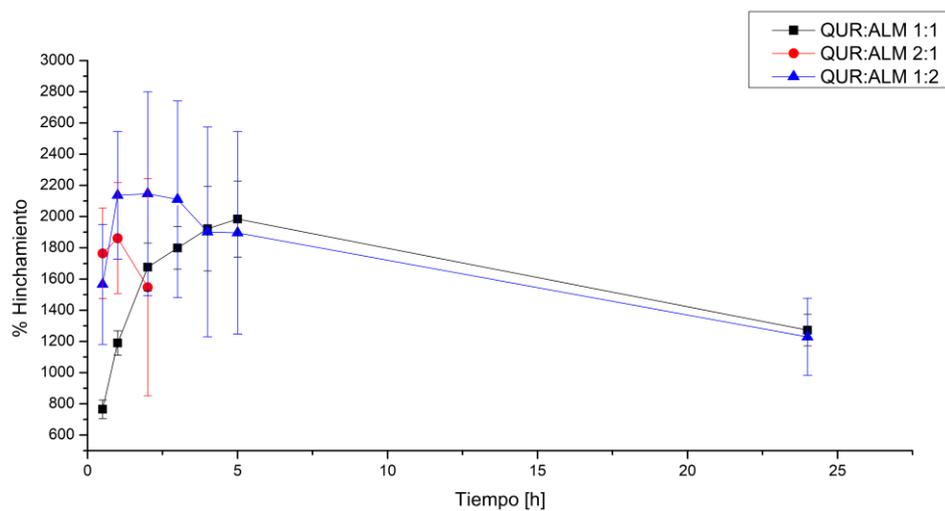


Figura 17. Graficas de hinchamiento de hidrogeles QUR:ALM a proporciones 1:1, 2:1 y 1:2.

4. CONCLUSIONES

Por medio de los tres intentos realizados para obtener un entrecruzamiento químico mediante reacciones de amidación o esterificación a través del solvente eutéctico profundo, fue en el último que se logró tener una funcionalización del quitosano debido a la reacción de la urea presente en el solvente con el quitosano, y por medio de este protocolo se formó hidrogeles conformados por la mezcla del quitosano funcionalizado y quitosano o almidón puro.

Se pudo constatar la funcionalización del biopolímero por medio del FTIR donde el cambio de las bandas carbonilo y amino antes y después del tratamiento con el SEP son sustanciales; de esta manera, se puede concluir que nuestro SEP actúa como solvente y como reactivo al mezclarlo con el quitosano, logrando la funcionalización del quitosano.

Los hidrogeles conformados por QUR y quitosano puro mostraron más durabilidad que los hidrogeles de QUR y almidón, los cuales solo perduran un tiempo máximo de 24h. Específicamente en los hidrogeles de QUR:QUI en proporción 2:1 muestra una gran capacidad de hinchamiento; si bien en la Figura 16, se puede observar que existe un decremento en la curva de hinchamiento en un rango de tiempo de 48 a 72 horas, el análisis estadístico ANOVA indicó que esta diferencia de porcentaje de hinchamiento no es significativa; no obstante, no se descarta la opción de que los hidrogeles de QUR:QUI en proporciones 1:1 y 1:2 son más estables en el tiempo, ya que en el análisis ANOVA mostró que no tiene una diferencia significativa a partir de las 5 horas.

A partir de los Análisis FTIR de los hidrogeles se logró caracterizar y observar los cambios en las bandas de los grupos amino y carbonilo conforme variaban las proporciones del QUR y el biopolímero, relacionando estos resultados con los de hinchamiento se concluye que el hidrogel no está relacionado a la intensidad que existe en las bandas amino y carbonilo,

pues el que más capacidad de hinchamiento tiene, es el que menor intensidad tiene de estas bandas comparado con los otros hidrogeles de QUR:QUI

Para complementar la presente investigación se realizarán análisis de microscopía electrónica de barrido, análisis termogravimétrico y espectroscopía Raman, de igual manera se realizarán las pruebas de hinchamiento de hidrogeles formados a partir de almidón funcionalizado y quitosano o almidón, ya que gracias a la funcionalización de biopolímeros mediante el SEP, se podrán implementar otros protocolos para formar nuevos materiales.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. Maitra, V. K. Shukla, and V. Kumar Shukla, “Cross-linking in hydrogels-a review,” *American Journal of Polymer Science*, vol. 2014, no. 2, pp. 25–31, doi: 10.5923/j.ajps.20140402.01.
- [2] E. Caló and V. V. Khutoryanskiy, “Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products,” *Eur Polym J*, vol. 65, pp. 252–267, Apr. 2015, doi: 10.1016/J.EURPOLYMJ.2014.11.024.
- [3] S. J. Buwalda, T. Vermonden, and W. E. Hennink, “Hydrogels for Therapeutic Delivery: Current Developments and Future Directions,” 2016, doi: 10.1021/acs.biomac.6b01604.
- [4] S. A. Lapidot and J. Kost, “Hydrogels,” *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, pp. 3878–3882, Jan. 2001, doi: 10.1016/B0-08-043152-6/00688-4.
- [5] T. R. Hoare and D. S. Kohane, “Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges,” *Polymer (Guildf)*, vol. 49, no. 8, pp. 1993–2007, Apr. 2008, doi: 10.1016/J.POLYMER.2008.01.027.
- [6] H. Shoukat, K. Buksh, S. Noreen, F. Pervaiz, and I. Maqbool, “Hydrogels as potential drug-delivery systems: Network design and applications,” *Ther Deliv*, vol. 12, no. 5, pp. 375–396, May 2021, doi: 10.4155/TDE-2020-0114.
- [7] A. Mahmood, D. Patel, B. Hickson, J. Desrochers, and X. Hu, “Recent Progress in Biopolymer-Based Hydrogel Materials for Biomedical Applications,” *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 3, p. 23, Feb. 2022, doi: 10.3390/IJMS23031415.
- [8] S. Bashir *et al.*, “polymers Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties, and Their Applications”, doi: 10.3390/polym12112702.

- [9] M. R. Kasaai, "Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review," *J Agric Food Chem*, vol. 57, no. 5, pp. 1667–1676, Mar. 2009, doi: 10.1021/JF803001M.
- [10] F. Ahmadi, Z. Oveisi, M. Samani, and Z. Amoozgar, "Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications," *Res Pharm Sci*, vol. 10, no. 1, p. 1, Feb. 2015, Accessed: May 06, 2023. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC4578208/
- [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 Pharm Sin B*, vol. 2, no. 5, pp. 439–449, Oct. 2012, doi: 10.1016/J.APSB.2012.07.004.
- [12] N. Gull *et al.*, "Designing of biocompatible and biodegradable chitosan based crosslinked hydrogel for in vitro release of encapsulated povidone-iodine: A clinical translation," *Int J Biol Macromol*, vol. 164, pp. 4370–4380, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.09.031.
- [13] J. Amirian *et al.*, "In-situ crosslinked hydrogel based on amidated pectin/oxidized chitosan as potential wound dressing for skin repairing," *Carbohydr Polym*, vol. 251, p. 117005, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2020.117005.
- [14] K. Supare and P. Mahanwar, "Starch-Chitosan Hydrogels for the Controlled-Release of Herbicide in Agricultural Applications: A Study on the Effect of the Concentration of Raw Materials and Crosslinkers," *J Polym Environ*, vol. 30, no. 6, pp. 2448–2461, Jun. 2022, doi: 10.1007/S10924-022-02379-4/METRICS.
- [15] S. Theodore and P. S. T. Sai, "Esterification of ethanol with sulfuric acid: A kinetic study," *Can J Chem Eng*, vol. 79, no. 1, pp. 54–64, Feb. 2001, doi: 10.1002/CJCE.5450790109.

- [16] M. Rogozinski, “The Methanol—Sulfuric Acid Esterification Methods. II. An Improved Extraction Procedure,” *J Chromatogr Sci*, vol. 2, no. 10, pp. 328–329, Oct. 1964, doi: 10.1093/CHROMSCI/2.10.328.
- [17] B. D. Mkhonazi, M. Shandu, R. Tshinavhe, S. B. Simelane, and P. T. Moshapo, “Solvent-free iron(III) chloride-catalyzed direct amidation of esters,” *Molecules*, vol. 25, no. 5, Feb. 2020, doi: 10.3390/MOLECULES25051040.
- [18] A. P. Abbott, D. Boothby, G. Capper, D. L. Davies, and R. K. Rasheed, “Deep Eutectic Solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids,” *J Am Chem Soc*, vol. 126, no. 29, pp. 9142–9147, Jul. 2004, doi: 10.1021/JA048266J/SUPPL_FILE/JA048266JSI20040521_085323.PDF.
- [19] “Making esters from alcohols and acids | Experiment | RSC Education.”
<https://edu.rsc.org/experiments/making-esters-from-alcohols-and-acids/1743.article>
(accessed May 06, 2023).
- [20] J. V Diaz, G. E. Anthon, and D. M. Barrett, “Nonenzymatic Degradation of Citrus Pectin and Pectate during Prolonged Heating: Effects of pH, Temperature, and Degree of Methyl Esterification,” 2007, doi: 10.1021/jf0701483.
- [21] E. E. Santos, R. C. Amaro, C. C. C. Bustamante, M. H. A. Guerra, L. C. Soares, and R. E. S. Froes, “Extraction of pectin from agroindustrial residue with an ecofriendly solvent: use of FTIR and chemometrics to differentiate pectins according to degree of methyl esterification,” *Food Hydrocoll*, vol. 107, p. 105921, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.FOODHYD.2020.105921.
- [22] S.-G. Anicuta, L. Dobre, M. Stroescu, and I. Jipa, “FOURIER TRANSFORM INFRARED (FTIR) SPECTROSCOPY FOR CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL FILMS CONTAINING CHITOSAN,” 2010.

- [23] E. Safitri *et al.*, “Optical pH sensor based on immobilization anthocyanin from *dioscorea alata* L. Onto polyelectrolyte complex pectin–chitosan membrane for a determination method of salivary pH,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 8, Apr. 2021, doi: 10.3390/POLYM13081276.
- [24] A. Pérez Cordero, J. Rojas Sierra, J. Rodriguez Ruiz, I. Arrieta Alvarez, Y. Arrieta Alvarez, and A. Rodríguez Carrascal, “Actividad antibacteriana de soluciones acidas de quitosano obtenido de exoesqueleto de camarón,” *Rev Colomb Biotecnol*, vol. 16, no. 1, p. 104, Jun. 2014, doi: 10.15446/REV.COLOMB.BIOTE.V16N1.44251.
- [25] J. Zhang *et al.*, “Synthesis of urea-functionalized chitosan derivatives for potential antifungal and antioxidant applications,” *Carbohydr Polym*, vol. 215, pp. 108–118, Jul. 2019, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2019.03.067.
- [26] K. Zhang, W. Feng, and C. Jin, “Protocol efficiently measuring the swelling rate of hydrogels,” *MethodsX*, vol. 7, Jan. 2019, doi: 10.1016/J.MEX.2019.100779.
- [27] 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, Nov. 2014, doi: 10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2014.08.006.
- [28] M. Majzoobi and P. Beparva, “Effects of acetic acid and lactic acid on physicochemical characteristics of native and cross-linked wheat starches,” *Food Chem*, vol. 147, pp. 312–317, 2014, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2013.09.148.

ANEXO A: ANALISIS ANOVA

5.1 Hinchamiento hidrogeles QUR:QUI

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tiempo	8	2753	344,10	14,95	0,000
proporcion	2	11076	5537,81	240,64	0,000
Tiempo*proporcion	16	1151	71,95	3,13	0,001
Error	54	1243	23,01		
Total	80	16222			

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
4,79714	92,34%	88,65%	82,76%

Tukey Pairwise Comparisons: Response = %hinch, Term = Tiempo

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tiempo	N	Mean	Grouping
48,0	9	24,0849	A
24,0	9	23,6059	A
72,0	9	18,0315	A B
5,0	9	17,5394	A B
4,0	9	16,2716	B
3,0	9	15,0052	B C
2,0	9	12,4801	B C D
1,0	9	8,4194	C D

Tukey Pairwise Comparisons: Response = %hinch, Term = proporcion

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

proporcion	N	Mean	Grouping
33	27	32,1385	A
50	27	8,8616	B
66	27	6,0449	B

Tukey Pairwise Comparisons: Response = %hinch, Term = Tiempo*proporcion

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tiempo*proporcion	N	Mean	Grouping
24,0 33	3	47,6523	A
48,0 33	3	46,5539	A B
5,0 33	3	36,2572	A B C
72,0 33	3	35,1674	A B C
4,0 33	3	33,6857	A B C
3,0 33	3	32,3534	B C D
2,0 33	3	26,9277	C D E
1,0 33	3	18,1764	D E F
48,0 50	3	15,0324	E F G
24,0 50	3	13,3155	E F G
72,0 50	3	13,1590	E F G
0,5 33	3	12,4728	E F G
48,0 66	3	10,6685	F G
24,0 66	3	9,8500	F G
5,0 50	3	9,6783	F G
4,0 50	3	8,8931	F G
3,0 50	3	7,2427	F G
5,0 66	3	6,6827	F G
4,0 66	3	6,2361	F G
2,0 50	3	5,9211	F G
72,0 66	3	5,7682	F G
3,0 66	3	5,4193	F G
2,0 66	3	4,5915	F G
1,0 50	3	3,9928	F G
1,0 66	3	3,0891	F G
0,5 50	3	2,5198	G
0,5 66	3	2,0990	G

5.2 Hinchamiento hidrogel QUR:ALM

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
proporcion	2	1069,4	534,70	48,75	0,000
Tiempo	8	3178,7	397,34	36,22	0,000
proporcion*Tiempo	16	1878,1	117,38	10,70	0,000
Error	54	592,3	10,97		
Total	80	6718,5			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
3,31193	91,18%	86,94%	80,16%

Comparisons for %hinch

Tukey Pairwise Comparisons: Response = %hinch, Term = proporcion

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

proporcion	N	Mean	Grouping
66	27	14,4298	A
50	27	11,7873	B
33	27	5,7482	C

Tukey Pairwise Comparisons: Response = %hinch, Term = Tiempo

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tiempo	N	Mean	Grouping
2,0	9	17,8969	A
1,0	9	17,2956	A B
0,5	9	13,6513	A B
3,0	9	13,0349	A B C
5,0	9	12,9335	A B C
4,0	9	12,7475	B C
24,0	9	8,3361	C
48,0	9	0,0000	D
72,0	9	0,0000	D

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Tukey Pairwise Comparisons: Response = %hinch, Term = proporcion*Tiempo

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

proporcion*Tiempo	N	Mean	Grouping
66 2,0	3	21,4651	A
66 1,0	3	21,3674	A
66 3,0	3	21,1090	A
50 5,0	3	19,8432	A
50 4,0	3	19,2184	A
66 4,0	3	19,0242	A
66 5,0	3	18,9574	A
33 1,0	3	18,6213	A
50 3,0	3	17,9958	A B
33 0,5	3	17,6478	A B
50 2,0	3	16,7605	A B
66 0,5	3	15,6544	A B

33 2,0	3 15,4650	A B
50 24,0	3 12,7179	A B
66 24,0	3 12,2905	A B
50 1,0	3 11,8982	A B
50 0,5	3 7,6517	B C
33 48,0	3 0,0000	C
33 72,0	3 0,0000	C
50 48,0	3 0,0000	C
50 72,0	3 0,0000	C
33 5,0	3 0,0000	C
33 4,0	3 0,0000	C
66 72,0	3 0,0000	C
66 48,0	3 0,0000	C
33 24,0	3 -0,0000	C
33 3,0	3 -0,0000	C