

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

Desarrollo de hidrogeles de pectina-quitosano entrecruzados con ésteres metálicos de ácido cítrico para liberación controlada de fármaco

Camila Alexandra Mesías Quinteros

Ingeniería Química

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

Quito, 19 de diciembre de 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Desarrollo de hidrogeles de pectina-quitosano entrecruzados con ésteres metílicos de ácido cítrico para liberación controlada de fármaco

Camila Alexandra Mesías Quinteros

Nombre del profesor, Título académico

José Álvarez, PhD

Nombre del profesor, Título académico

José Mora, PhD

Quito, 19 de diciembre 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: Camila Alexandra Mesías Quinteros

Código: 00211917

Cédula de identidad: 1722163944

Lugar y fecha: Quito, 19 de diciembre 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UNPUBLISHED DOCUMENT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 transcurso de la presente investigación, se diseñaron hidrogeles a partir de pectina y quitosano, utilizando ácido cítrico esterificado como agente entrecruzante con el propósito de lograr una liberación controlada de fármacos. La utilización de este agente entrecruzante posibilitó la evaluación de la estabilidad de los hidrogeles, variando la concentración polimérica, la concentración de éster y las proporciones de pectina y quitosano. El ácido cítrico esterificado generó trietilcitrato como producto, facilitando la formación de los hidrogeles. Posteriormente, los hidrogeles obtenidos fueron sometidos a un exhaustivo análisis que incluyó pruebas químicas, como la Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), así como análisis físicos mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM), pruebas de estabilidad y, finalmente, evaluaciones de liberación controlada de acetaminofén. Los resultados indicaron que los hidrogeles presentan una mayor estabilidad con una concentración polimérica más elevada. Es notable que aquellos hidrogeles con una proporción (2:1) de pectina a quitosano exhibieron una mayor capacidad de hinchamiento, atribuible a la destacada capacidad de absorción de agua de la pectina. Esta tendencia se mantuvo constante en todos los hidrogeles sometidos a la prueba. En conclusión, el uso del ácido cítrico esterificado demostró ser efectivo para lograr un entrecruzamiento óptimo en los hidrogeles, permitiendo así una eficaz liberación controlada de fármacos.

Palabras clave: pectina, quitosano, hidrogel, ácido cítrico, entrecruzamiento, liberación controlada de fármaco, acetaminofén.

ABSTRACT

In the course of this research, hydrogels were designed from pectin and chitosan, using esterified citric acid as a crosslinking agent with the purpose of achieving a controlled release of drugs. The use of this crosslinking agent made it possible to evaluate the stability of the hydrogels by varying the polymeric concentration, the ester concentration and the proportions of pectin and chitosan. The esterified citric acid generated triethylcitrate as a product, facilitating the formation of hydrogels. Subsequently, the obtained hydrogels were subjected to an exhaustive analysis that included chemical tests, such as Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), as well as physical analysis by Scanning Electron Microscopy (SEM), stability tests and, finally, controlled release evaluations of acetaminophen. The results indicated that hydrogels exhibit higher stability with higher polymer concentration. It is notable that those hydrogels with a ratio (2:1) of pectin to chitosan exhibited a higher swelling capacity, attributable to the outstanding water absorption capacity of pectin. This trend remained constant in all hydrogels tested. In conclusion, the use of esterified citric acid proved to be effective in achieving optimal crosslinking in hydrogels, thus enabling efficient controlled drug release.

Key words: pectin, chitosan, hydrogel, citric acid, crosslinking, controlled drug release, acetaminophen.

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación se lo dedico a mi familia, especialmente a mi madre quién ha sido un apoyo fundamental a lo largo de mi vida. Por otro lado, quiero dedicar este trabajo a mi ángel en el cielo, que sé que estaría orgulloso de verme cumplir una meta más, una que él soñaba acompañarme.

Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios por haberme dado la oportunidad de estudiar en tan prestigiosa Universidad como lo es la USFQ. A mis padres por haberme dado la educación, a los profes e instructores que además de impartir clases fueron un apoyo día a día. A mi hermano y sobrina que han sido un apoyo moral y emocional durante este tiempo universitario. A mis amigas del colegio que estuvieron en cada paso que he dado. Finalmente, quiero agradecer a mis amigos que hice en la Universidad porque han sido un apoyo durante estos cuatro años.

Índice

Introducción	14
Metodología	17
2.1 Preparación de hidrogeles con ácido cítrico (AC)	17
2.1.1 Esterificación del ácido cítrico en trietilcitrato	17
2.1.2 Preparación de hidrogeles	17
2.2 Análisis de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier, FTIR	17
2.3 Prueba de hinchamiento	18
2.4 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés)	18
2.5 Liberación de Acetaminofén	18
2.6 Análisis Estadístico	19
Resultados y Discusiones	20
3.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier, FTIR	20
3.2 Morfología de los hidrogeles	22
3.3 Estabilidad de los hidrogeles	25
3.4 Liberación controlada de Acetaminofén	27
Conclusiones y Recomendaciones	29
Referencias:	31
Anexos	34
ANEXO A: ESPECTROS PARA UNA CONCENTRACIÓN POLIMÉRICA DE 2% P/V...	34
ANEXO B: ESPECTROS PARA UNA CONCENTRACIÓN POLIMÉRICA DE 3% P/V...	36
ANEXO C: ESPECTROS PARA UNA CONCENTRACIÓN POLIMÉRICA DE 4% P/V...	39

ANEXO D: ESPECTROS PARA PECTINA Y QUITOSANO.....	41
ANEXO E: ESTABILIDAD DE LOS HIDROGELES PARA UNA CONCENTRACIÓN POLIMÉRICA DE 2% P/V.	42
ANEXO F: ESTABILIDAD DE LOS HIDROGELES PARA UNA CONCENTRACIÓN POLIMÉRICA DE 3% P/V.	44
ANEXO G: ESTABILIDAD DE LOS HIDROGELES PARA UNA CONCENTRACIÓN POLIMÉRICA DE 4% P/V.	47
ANEXO H: CURVA DE CALIBRACIÓN DE ACETAMINOFÉN	49
ANEXO I: RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS ANOVA Y TUKEY	50
I.A Hinchamiento.....	50
I.B Liberación de Acetaminofén	51

Índice de Figuras

Figura 1. Espectros FTIR de: a) Control hidrogel, proporción 2:1 P-Q, b) Hidrogel proporción 2:1 P-Q, c) Control hidrogel proporción 1:2 P-Q, d) Hidrogel proporción 1:2 P-Q, e) Control hidrogel proporción 1:1 P-Q, f) Hidrogel proporción 1:1 P-Q.	21
Figura 2. Espectros FTIR en un rango de 900-1900 cm^{-1} de: a) Control hidrogel, proporción 2:1 P-Q, b) Hidrogel proporción 2:1 P-Q, c) Control hidrogel proporción 1:2 P-Q, d) Hidrogel proporción 1:2 P-Q, e) Control hidrogel proporción 1:1 P-Q, f) Hidrogel proporción 1:1 P-Q.....	22
Figura 3. Apariencia del hidrogel 4% p/v, 1:2 P-Q, después de la reacción.	23
Figura 4. Micrografías electrónicas de barrido de: a) Hidrogel 1:1 Pectina-Quitósano, b) Hidrogel 1:2 Pectina-Quitósano, c) Hidrogel 2:1 Pectina-Quitósano. Magnificación: 100X, barra de calibración 100 μm	24
Figura 5. Micrografías electrónicas de barrido de: a) Hidrogel 1:1 Pectina-Quitósano, b) Hidrogel 1:2 Pectina-Quitósano, c) Hidrogel 2:1 Pectina-Quitósano. Magnificación: 200X, barra de calibración 100 μm	25
Figura 6. Estabilidad de los hidrogeles, con una concentración polimérica 4% p/v y una concentración de éster de 70 mM, con sus diferentes proporciones poliméricas.	26
Figura 7. Liberación controlada de acetaminofén.	27
Figura 8. Espectros de FTIR de los hidrogeles de 2% p/v con una concentración de éster de 100mM con sus diferentes proporciones poliméricas.	34
Figura 9. Espectros de FTIR de los hidrogeles de 2% p/v con una concentración de éster de 90mM con sus diferentes proporciones poliméricas.	35
Figura 10. Espectros de FTIR de los hidrogeles de 3% p/v con una concentración de éster de 100mM con sus diferentes proporciones poliméricas.	36
Figura 11. Espectros de FTIR de los hidrogeles de 3% p/v con una concentración de éster de 90mM con sus diferentes proporciones poliméricas.	37
Figura 12. Espectros de FTIR de los hidrogeles de 3% p/v con una concentración de éster de 80mM con sus diferentes proporciones poliméricas.	37

Figura 13. Espectros de FTIR de los hidrogeles de 3% p/v con una concentración de éster de 70mM con sus diferentes proporciones poliméricas.....	38
Figura 14. Espectros de FTIR de los hidrogeles de 4% p/v con una concentración de éster de 100mM con sus diferentes proporciones poliméricas.....	39
Figura 15. Espectros de FTIR de los hidrogeles de 4% p/v con una concentración de éster de 90mM con sus diferentes proporciones poliméricas.....	40
Figura 16. Espectros de FTIR de los hidrogeles de 4% p/v con una concentración de éster de 80mM con sus diferentes proporciones poliméricas.....	40
Figura 17. Espectros de FTIR de la Pectina y Quitosano con y sin éster.	41
Figura 18. Estabilidad de los hidrogeles de 2% p/v con una concentración de éster de 100mM con sus diferentes proporciones poliméricas.....	42
Figura 19. Estabilidad de los hidrogeles de 2% p/v con una concentración de éster de 90mM con sus diferentes proporciones poliméricas.....	43
Figura 20. Estabilidad de los hidrogeles de 3% p/v con una concentración de éster de 100mM con sus diferentes proporciones poliméricas.....	44
Figura 21. Estabilidad de los hidrogeles de 3% p/v con una concentración de éster de 90mM con sus diferentes proporciones poliméricas.....	45
Figura 22. Estabilidad de los hidrogeles de 3% p/v con una concentración de éster de 80mM con sus diferentes proporciones poliméricas.....	45
Figura 23. Estabilidad de los hidrogeles de 3% p/v con una concentración de éster de 70mM con sus diferentes proporciones poliméricas.....	46
Figura 24. Estabilidad de los hidrogeles de 4% p/v con una concentración de éster de 100mM con sus diferentes proporciones poliméricas.....	47
Figura 25. Estabilidad de los hidrogeles de 4% p/v con una concentración de éster de 90mM con sus diferentes proporciones poliméricas.....	48
Figura 26. Estabilidad de los hidrogeles de 4% p/v con una concentración de éster de 80mM con sus diferentes proporciones poliméricas.....	48

Figura 27. Curva de Calibración de Acetaminofén. 49

Introducción

En los últimos años se han realizado varias investigaciones sobre el uso de polímeros sintéticos o naturales para aplicaciones biomédicas. Los polímeros naturales pueden ser utilizados para elaborar biomateriales, con lo cual, se han logrado importantes avances en el área biomédica. Así mismo, la formación de estructuras a base de estos polímeros, permiten reducir el impacto ambiental, pues admiten la utilización de residuos.

Los materiales utilizados en la creación de películas y recubrimientos biodegradables se componen principalmente de proteínas, lípidos y polisacáridos, que incluyen celulosa, quitosano (CS), almidones, dextrinas, alginatos y pectinas [1]. En la presente investigación se hace uso de dos biopolímeros: pectina y quitosano. La pectina también se la conoce como ácido poligalacturónico, la cual constituye un componente fundamental en las paredes celulares de las plantas y puede ser obtenida mediante diversos métodos [2]. Por su lado, el quitosano es un polisacárido lineal seminatural, que se obtiene a partir de la quitina, mediante un proceso de desacetilación alcalina. La abundancia de quitina en la naturaleza y la simplicidad de su desacetilación, hacen que el CS sea un polímero económico, refiriéndose a aspectos financieros. Este polímero es biocompatible, biodegradable, tiene baja toxicidad y ha demostrado tener actividad antimicrobiana y antioxidante. Además, debido a su carga catiónica natural, posee excelentes propiedades de adherencia a las mucosas y, en combinación con su destacada capacidad de formación de hidrogeles, se utiliza ampliamente en diversas aplicaciones, incluyendo la administración de fármacos y la ingeniería de tejidos [3].

Para poder llevar a cabo la formación de un hidrogel, se necesita la presencia de un agente entrecruzante, el cual cumple una valiosa función en la formación de los mismos, ya que involucra la introducción de un agente de entrecruzamiento para reemplazar el grupo hidroxilo (-OH) ya que reacciona con el agente esterificado [4] [5]. Por otro lado, a la nueva estructura se agrega grupos carboxilo. En investigaciones biomédicas, durante la elaboración

de biomateriales o cualquier formación de estructuras que tengan que ser consumidas por el ser humano, se ha demostrado que el ácido cítrico (CA, por sus siglas en inglés) es un agente entrecruzante, no tóxico. El CA es conocido por tener ácido carboxílico trifuncional, el cual permite interactuar con los grupos hidroxilo (-OH), generando así, enlaces éster y fortaleciendo la formación de puentes de hidrógeno [4] [6]. El CA se destaca por su bajo costo en el mercado, convirtiéndolo en uno de los compuestos más utilizados para llevar a cabo entrecruzamiento. Además, desempeña un papel crucial en la aplicación biomédica, ya que regula el metabolismo y previene la formación de cálculos renales [5]. Gracias a este compuesto, se puede dar el entrecruzamiento con los biopolímeros para la formación de hidrogeles.

Los hidrogeles son estructuras que se pueden obtener a partir de materiales naturales o sintéticos, donde los naturales típicamente se originan de extractos de plantas o animales [2]; a estas estructuras se las conoce por su enorme capacidad de absorción y retención de líquidos, especialmente de agua o también, de cualquier clase de fluidos biológicos [7]. Los hidrogeles sintéticos son ampliamente utilizados en cultivos celulares debido a su naturaleza bioinerte. A diferencia de los polímeros naturales, estos hidrogeles exhiben notables propiedades bioquímicas, así como una excepcional rigidez y densidad. A través de investigaciones exhaustivas, en el campo biomédico se ha extendido el empleo generalizado de hidrogeles elaborados a partir de quitosano y pectina, ya sea en su forma pura o en combinación con otros polímeros naturales o sintéticos [8].

En los últimos años, los hidrogeles pueden ser empleados en diferentes aplicaciones, una de ellas es que se puede utilizar estas estructuras en liberaciones o recubrimientos de fármacos. Desde la perspectiva farmacéutica, la combinación de los biopolímeros que fueron mencionados anteriormente, presentan diversas ventajas con respecto al quitosano, ya que es tan biocompatible, como biodegradable. Las formulaciones que incorporan al quitosano como

un excipiente, exhiben una liberación prolongada del medicamento, así como, destacadas propiedades de adherencia a las mucosas [9].

El presente proyecto permitirá evaluar aspectos relacionados con la liberación controlada del fármaco, a efectos de examinar sus niveles de desintegración en la vía adecuada, donde el medicamento debe establecer su acción terapéutica, evitando efectos secundarios en otros órganos. La ventaja del uso de hidrogeles se debe a su capacidad para adaptarse a condiciones ambientales, como el pH, la fuerza iónica, la temperatura y la corriente eléctrica [10].

Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue evaluar la factibilidad de la elaboración de hidrogeles con base en pectina y quitosano con ácido cítrico esterificado, como un agente entrecruzante para una liberación controlada de fármacos. Al detalle, se valoró cómo actúa el ácido cítrico esterificado en la formación de hidrogeles; se estableció, cómo se implementan composiciones de pectina-quitosano para la elaboración de hidrogeles y se analizó, cómo se comportan los hidrogeles con la liberación controlada de medicamentos.

Metodología

2.1 Preparación de hidrogeles con ácido cítrico (AC)

2.1.1 Esterificación del ácido cítrico en trietilcitrate

Para el proceso de esterificación, se disolvió el ácido cítrico en metanol seco en una relación molar de 0.05:0.6, dentro de una plancha de calentamiento, con agitación constante. La reacción se la llevó hasta 60 °C, donde se adicionó ácido sulfúrico a 1% mol en relación con el ácido cítrico. Se dejó reaccionar durante 1 hora a 60 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se enfrió la solución, donde el pH alcanzó un valor de 1; para su uso la solución se mantuvo en refrigeración a una temperatura de 4 °C.

2.1.2 Preparación de hidrogeles

Se prepararon soluciones de 2 %, 3 % y 4 % p/v de la mezcla biopolimérica, al disolver pectina cítrica y quitosano (85 % desacetilado) en 1 mL de agua en diferentes proporciones másicas (1:1, 1:2 y 2:1) relación pectina-quitosano. Previamente, el agua fue pre-calentada hasta que alcanzó una temperatura de 60 °C. Una vez agregada el agua, se añadió el ácido cítrico esterificado en una relación de 350, 400, 450 y 500 $\text{mg Ácido/g biopolímero}$. Se mezclaron estos componentes en un homogeneizador Vortex y la mezcla se dejó entrecruzar durante 3 horas en baño María a 60 °C, tiempo definido como suficiente en ensayos preliminares para la formación de los hidrogeles. Una vez transcurrido el tiempo, se llevó a cabo dos ciclos de lavado, en agua destilada por 20 minutos, con agitación constante de 100 rpm. Finalmente, se secaron los hidrogeles a 40 °C, durante 48 horas.

2.2 Análisis de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier, FTIR

Se realizó el análisis en un equipo FTIR-ATR Agilent Cary 630. Los espectros se tomaron con una resolución de 16 s^{-1} y 128 análisis en la región IR de 648-4003 cm^{-1} .

2.3 Prueba de hinchamiento

El ensayo de hinchamiento se utilizó como una medida indirecta de la estabilidad de los hidrogeles en condiciones fisiológicas. Para esto, se tomó el peso inicial de los hidrogeles secos, y luego se incubaron en buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés, pH 7.3) a 37 °C en una incubadora microbiológica durante 72 horas. Se tomó el peso de los mismo en tiempos específicos (1h, 2h, 3h, 24h, 48h, 72h), y se calculó el %H a través de la ecuación 1.

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

Donde m_t es el peso de hidrogel en el tiempo t y m_i es la masa inicial en seco de los hidrogeles.

2.4 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés)

La morfología de los hidrogeles se estudió a través de SEM a los distintos hidrogeles. Los hidrogeles fueron previamente congelados y liofilizados. Para el análisis, las muestras fueron recubiertas con oro en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-IT300 a una presión de 30 bar y un voltaje de 20 kV. Las muestras sometidas a esta microscopia se observaron en magnificaciones de x25, x100 y x200.

2.5 Liberación de Acetaminofén

Se prepararon hidrogeles encapsulando acetaminofén estándar (Sigma-Aldrich A3035), con una relación del 5 % p/p del fármaco con respecto a la masa biopolimérica. Se mezcló el acetaminofén con los polímeros antes de agregar el agente entrecruzante. Una vez agregado el éster a la mezcla, se formaron los hidrogeles como se explicó previamente.

Una vez secos los hidrogeles, se colocaron en pocillos y se incubaron en PBS a 37 °C. Se tomaron alícuotas de 100 μ L en tiempos específicos (1h, 2h, 3h, 5h, 6h, 24h, 48h, 72h), donde el volumen retirado fue reemplazado por PBS fresco. Las alícuotas que fueron tomadas,

se diluyeron en 2 mL de PBS para poder medir la absorbancia mediante un espectrofotómetro de absorción UV-VIS CECIL CE2041. Se realizaron mediciones en diferentes intervalos de tiempo utilizando alícuotas, y se empleó un análisis de barrido en un rango de longitud de onda de 235 a 550 nm. Esta elección se basó en la literatura, que sugiere que la absorción máxima para el acetaminofén se encuentra en el rango de 241 a 243 nm [11]. La concentración se determinó con una curva de calibración, previamente realizada con soluciones de acetaminofén, en concentración conocida. Finalmente, el porcentaje de fármaco liberado se determinó mediante la ecuación 2 [2].

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

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

2.6 Análisis Estadístico

Los ensayos se realizaron por cuadruplicado ($n=4$), y los valores de hinchamiento y liberación se reportan con el promedio \pm de la desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza, ANOVA, para determinar efectos significativos, y se hizo una comparación por pares de Tukey con un 95% de confianza.

Resultados y Discusiones

3.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier, FTIR

Mediante el análisis de FTIR, se puede identificar el entrecruzamiento que se logra al agregar el agente entrecruzante (ácido cítrico esterificado), a la mezcla polimérica. Para esto, se realizó una comparación de todos los hidrogeles que contienen éster y el control, que es el hidrogel sin la adición del éster, donde se realiza comparaciones para observar los cambios en las vibraciones y los picos de los grupos funcionales de interés. En la Figura 1, se presentan los espectros del hidrogel al 4 % p/v de la mezcla polimérica, con sus respectivos controles y y proporciones pectina-quitosano (P-Q), además que se encuentra señalada el área de interés que se va a analizar posteriormente.

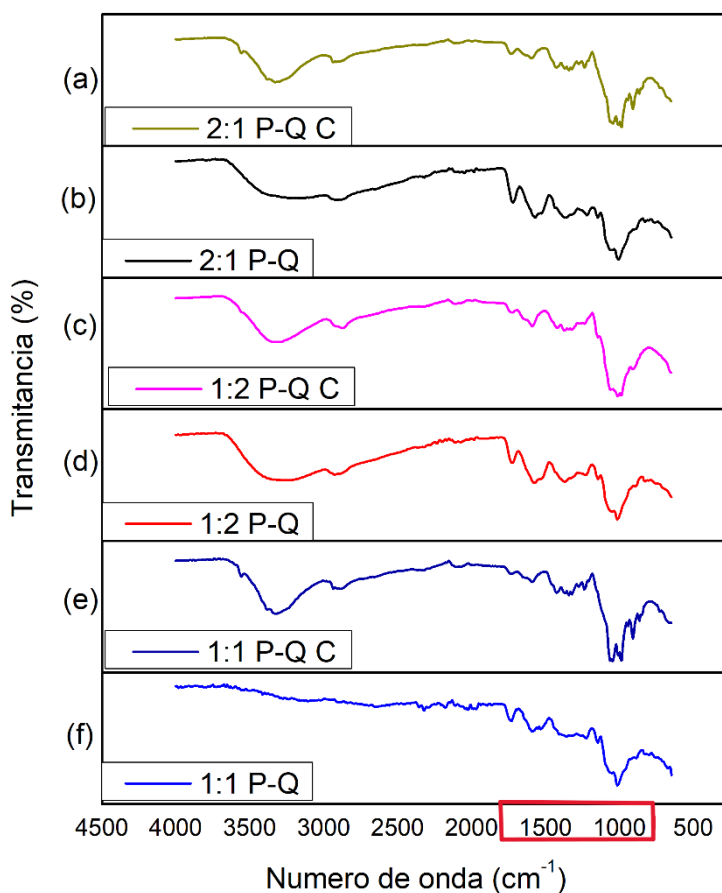


Figura 1. Espectros FTIR de: a) Control hidrogel, proporción 2:1 P-Q, b) Hidrogel proporción 2:1 P-Q, c) Control hidrogel proporción 1:2 P-Q, d) Hidrogel proporción 1:2 P-Q, e) Control hidrogel proporción 1:1 P-Q, f) Hidrogel proporción 1:1 P-Q.

En los espectros de los hidrogeles y sus respectivos controles se presentan los mayores cambios en un intervalo de $900\text{-}1900\text{ cm}^{-1}$, y una ampliación de esta región se presenta en la Figura 2, donde se señalan los picos de interés, así como los grupos funcionales característicos de cada polímero. En la banda de 1630 cm^{-1} , se puede observar el grupo del ácido carboxílico ($-\text{COOH}$) [[3]. También se puede apreciar la bandas de 1315 cm^{-1} , que corresponde al grupo (C-N) [12], [13]. En referencia a las bandas de 1656 y 1584 cm^{-1} , éstas corresponden, en el mismo orden, a los picos de los grupos amida I y II [3]. Finalmente, existe el surgimiento de un pico en la banda de 1720 cm^{-1} , que sugiere la formación de un grupo éster en la estructura [4].

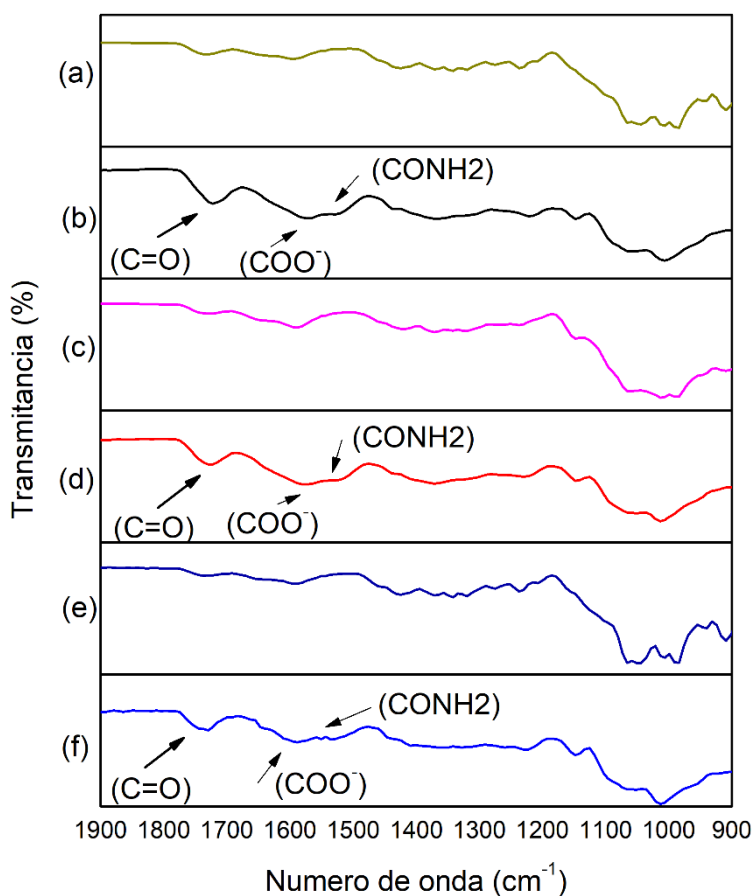


Figura 2. Espectros FTIR en un rango de 900-1900 cm^{-1} de: a) Control hidrogel, proporción 2:1 P-Q, b) Hidrogel proporción 2:1 P-Q, c) Control hidrogel proporción 1:2 P-Q, d) Hidrogel proporción 1:2 P-Q, e) Control hidrogel proporción 1:1 P-Q, f) Hidrogel proporción 1:1 P-Q.

Para el caso de la pectina, se tiene vibraciones alrededor de 1689 y 1762 cm^{-1} , los correspondientes al grupo carboxilo ($-\text{C}=\text{O}$), como se mencionó anteriormente, así como al grupo carboximetilo ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$) [14]. Para el caso del quitosano, se detectan vibraciones en ciertos picos, los cuales, pueden ser comparados con los controles o blancos, ya que ellos no poseen de estas vibraciones al no tener el agente entrecruzante en su mezcla. Alrededor de 1653 cm^{-1} , se aprecia el pico característico del grupo carboxilo ($-\text{C}=\text{O}$), pero para el quitosano, además de que alrededor de 1600 cm^{-1} se tiene la vibración del grupo ($-\text{NH}$) en la amina primaria [15]. A través de este análisis, es posible identificar el grado de entrecruzamiento entre el ácido cítrico esterificado y la mezcla polimérica, mediante la observación del aumento en el área en los puntos específicos mencionados anteriormente. Estos puntos hacen referencia a los grupos funcionales de interés.

3.2 Morfología de los hidrogeles

En la Figura 3 se puede observar cómo es la estructura macroscópica de un hidrogel después de la reacción de entrecruzamiento con el éster, el cual presenta una apariencia sólida y uniforme. Adicional, se estudió la morfología de los hidrogeles mediante microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés).



Figura 3. Apariencia del hidrogel 4% p/v, 1:2 P-Q, después de la reacción.

En la Figura 4 se puede observar la estructura desde una forma microscópica con una magnificación de 100x, donde se analiza la porosidad de los hidrogeles. En el caso del hidrogel con una composición P-Q 1:1 (Figura 4-a), se puede ver que existen poros, son pocos, pero grandes, además de tener una formación de láminas o filamentos. Paralelamente, se ha establecido que, cuando el hidrogel posee mayor cantidad de quitosano (1:2), su estructura es mucho más porosa e irregular, en comparación con el caso anterior (Figura 4-b), teniendo en cuenta que ya no presenta la misma apariencia de láminas o filamentos que la estructura que posee la misma cantidad de pectina y quitosano (Figura 4-a). Finalmente, para el hidrogel que posee más pectina que quitosano (2:1), a diferencia de los anteriores, este presenta menos porosidad (Figura 4-c); sin embargo, se puede observar cómo esta presenta una apariencia más rugosa que las otras dos estructuras.

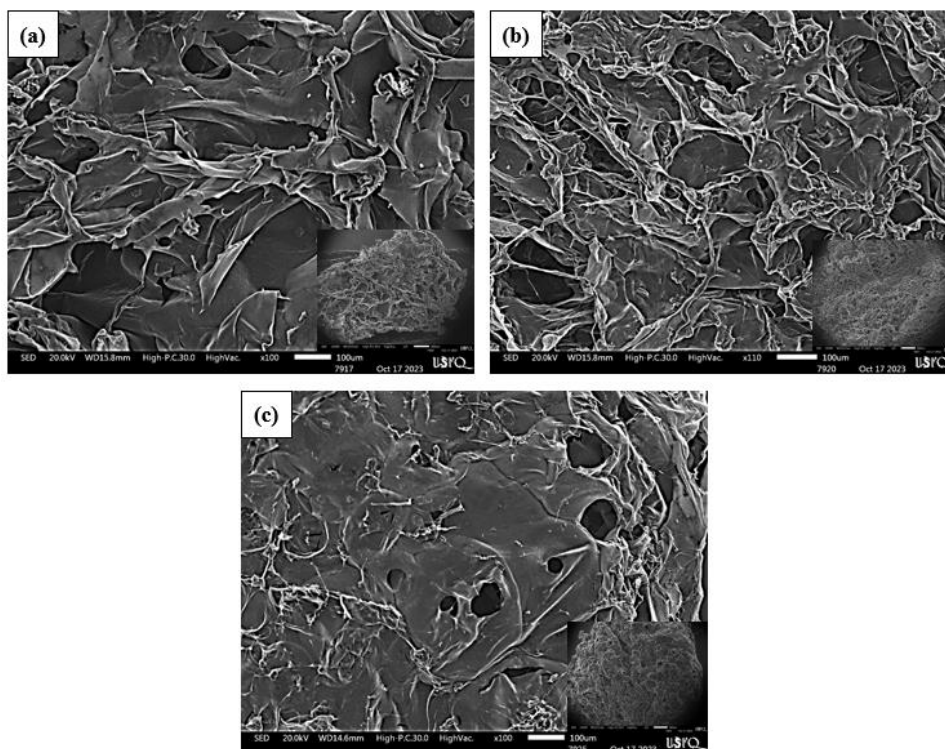


Figura 4. Micrografías electrónicas de barrido de: a) Hidrogel 1:1 Pectina-Quitosano, b) Hidrogel 1:2 Pectina-Quitosano, c) Hidrogel 2:1 Pectina-Quitosano. Magnificación: 100X, barra de calibración 100 μm .

En la Figura 5 se pueden observar los mismos hidrogeles, pero esta vez con una magnificación de 200x. Esto permite que se analice de mejor manera el tamaño de los poros y a su vez su estructura. Como se mencionó anteriormente, el hidrogel tiene la misma cantidad de pectina y quitosano, y posee poros, pero no tantos como las otras dos estructuras. Por su lado, en la Figura 5-a se logran visualizar los filamentos o láminas que posee junto a los pocos poros que se encontró en esta estructura. En cambio, si se analiza la Figura 5-b, tiene filamentos, sin embargo, los poros que posee esta estructura son más grandes, formando así una especie de túnel dentro del hidrogel. Finalmente, en la Figura 5-c, se puede analizar a sus poros y la rugosidad que éste posee. En esta estructura, la que específicamente que contiene mayor cantidad de pectina que quitosano (2:1), se observa homogeneidad y poros más grandes

permite que al hidrogel pueda ingresar mayor cantidad de agua que los otros dos hidrogeles [15].

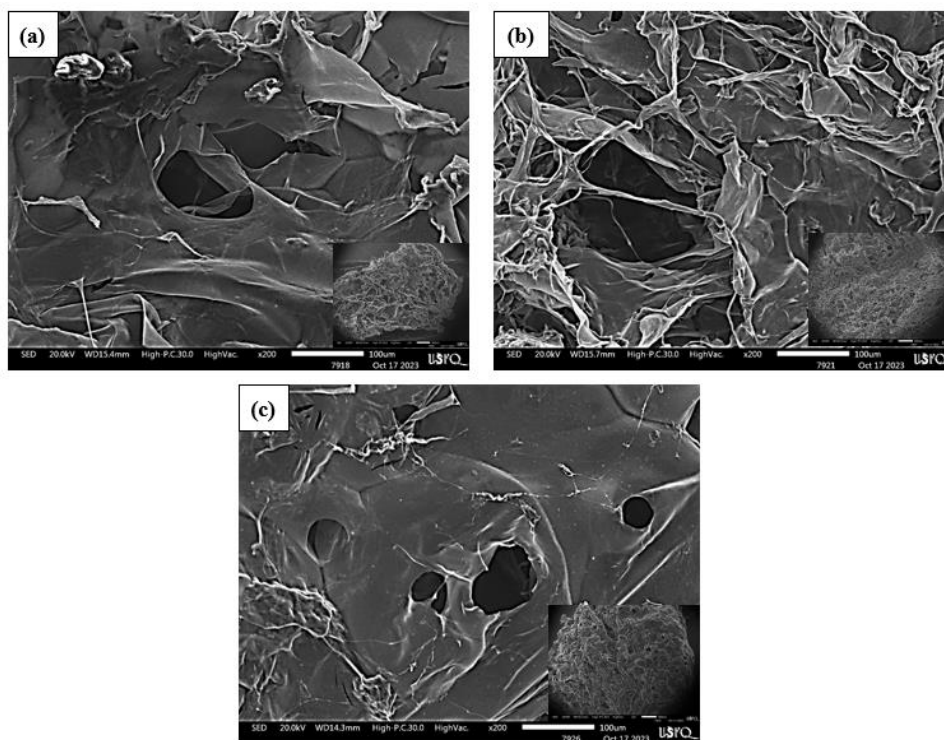


Figura 5. Micrografías electrónicas de barrido de: a) Hidrogel 1:1 Pectina-Quitosano, b) Hidrogel 1:2 Pectina-Quitosano, c) Hidrogel 2:1 Pectina-Quitosano. Magnificación: 200X, barra de calibración 100 μm .

3.3 Estabilidad de los hidrogeles

Utilizando la herramienta de ANOVA se pudo determinar los factores de concentración polimérica, proporción polimérica, concentración de éster y tiempo, así como las interacciones que no incluyen tiempo, que tienen un efecto significativo en el grado de hinchamiento de los hidrogeles. Según estos análisis estadísticos y lo que muestra la Figura 6, se puede observar que, a partir de la segunda hora, no existe un cambio significativo en el grado de hinchamiento, manteniéndose constante hasta las 72 horas. Adicionalmente, el punto más alto de hinchamiento se alcanza en las 24 horas en todas las proporciones poliméricas analizadas.

Para cualquier concentración polimérica, es el hidrogel con mayor proporción de pectina (2:1) es el que mayor grado de hinchamiento tiene, seguido por la proporción que tiene la misma cantidad de pectina y quitosano (1:1), y teniendo como último al hidrogel, que contiene más quitosano (1:2). También se pudo analizar que el hidrogel más homogéneo es el que menos se hincha (1:2), ya que presenta errores pequeños en comparación con las otras proporciones poliméricas (1:1) y (2:1).

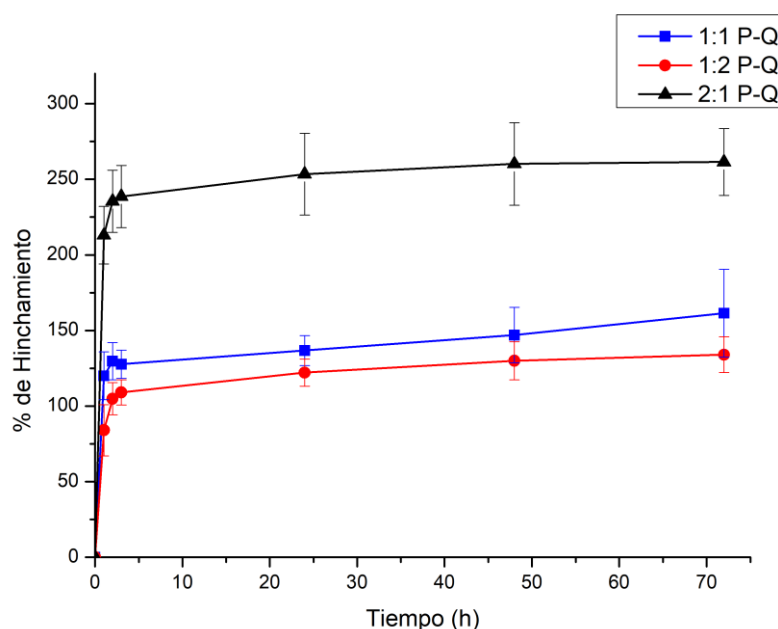


Figura 6. Estabilidad de los hidrogeles, con una concentración polimérica 4% p/v y una concentración de éster de 70 mm, con sus diferentes proporciones poliméricas.

En adición, gracias al análisis de Tukey con un 95 % de confianza, se determinó que las concentraciones poliméricas tratadas, tienen una gran diferencia en el grado de hinchamiento, ya que entre menor cantidad de polímero existe, éste se hincha más, pero es menos estable. Por lo que, al contener menor cantidad de polímero el entrecruzamiento se ve afectado, pues en la prueba de estabilidad de los hidrogeles se puede observar cómo se vuelven inestables [17], [18].

3.4 Liberación controlada de Acetaminofén

Para realizar la liberación de un fármaco, se escogió el hidrogel más estable y con menor grado de hinchamiento, dado que el análisis estadístico indicó que los que menos se hinchaban son los de concentración polimérica de 4% p/v, y que no existía una diferencia significativa entre las distintas concentraciones de éster. Es por eso que, para este caso, se escogió trabajar con los hidrogeles de concentración polimérica 4 % p/v con una concentración de éster de 70 mM, ya que son los más estables. Al realizar el análisis estadístico de la liberación y al observar la Figura 7, se llega a la conclusión que después de la segunda hora, no existe un cambio significativo. Es decir, que la mayor parte del fármaco se liberó en las dos primeras horas, por lo que a las 72 horas alcanza su punto más alto, pero no tiene un cambio significativo con la segunda hora. Adicionalmente, se determinó que tuvo una liberación superior al 65 %, llegando como el punto más alto, al 96 %.

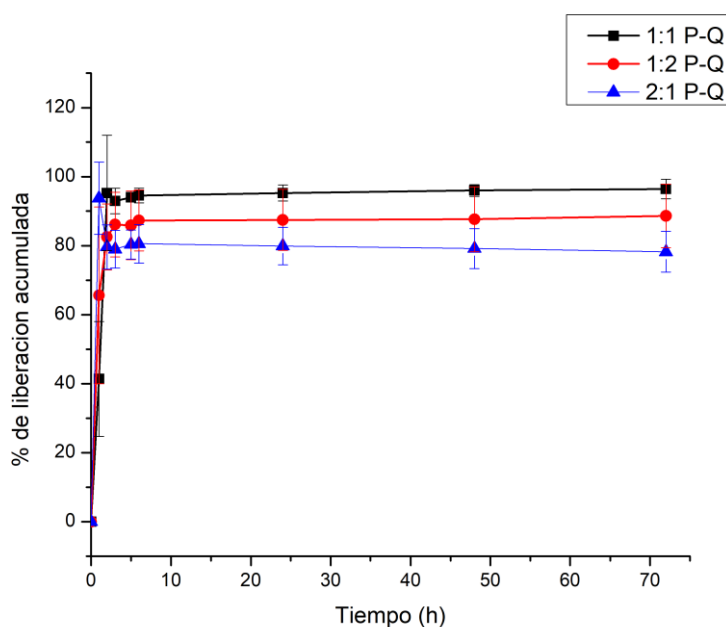


Figura 7. Liberación controlada de acetaminofén.

El acetaminofén también comercialmente conocido como paracetamol, fue el fármaco utilizado para esta liberación, por su uso en distintas investigaciones para la aplicación con los

hidrogeles [19]. El paracetamol posee grupos hidroxilo y amida, lo que le permite interactuar con la pectina y el quitosano, ya que estos dos polímeros también poseen grupos hidroxilo y amina, haciendo que se reduzca la velocidad de liberación [20]. Por otro lado, en terceras investigaciones, se ha destacado que los hidrogeles a base de pectina y quitosano llegan a liberar el fármaco en los primeros 10 minutos [7], haciendo así referencia que en la primera hora ya alcanza más del 40 % de liberación. Además, se demuestra que la cantidad de fármaco administrada a los hidrogeles, tienen un efecto en la liberación del mismo, ya que entre más fármaco, más rápida será la liberación [21].

Conclusiones y Recomendaciones

Los hidrogeles formados con ácido cítrico como agente entrecruzante tienen una buena estabilidad y capacidad de hinchamiento. Teniendo en cuenta que, a pesar de que se trabajó con distintas concentraciones poliméricas, todas respondieron de una manera satisfactoria al someterlas a la prueba de hinchamiento para observar su estabilidad; con lo cual, se concluye que, entre más concentración polimérica, el hidrogel es más estable y es menor su capacidad para hincharse. Gracias a la estabilidad que mostraron los hidrogeles de 4 % p/v, se pudo realizar la liberación controlada de acetaminofén, dando así un resultado favorable de liberación dentro de las primeras horas de reposo.

De acuerdo con la literatura establecida, el ácido cítrico funcionó de forma correcta al momento de ponerlo a reaccionar con los biopolímeros. Es así que, el ácido cítrico al ser un reactivo fácil de conseguir y su costo es más accesible que otros, se establece que éste es una buena opción para realizar la reacción de esterificación del ácido, dando como resultado el trietilcitrato, que será utilizado para la formación de los hidrogeles. De esta manera, el entrecruzamiento que se da con los biopolímeros, tiene una mejor estabilidad, cuando la proporción polimérica contiene más quitosano (1:2), ya que su grado de hinchamiento no es tan alto y su estructura es porosa, pero compacta. Determinando así, que el entrecruzamiento se da por la afinidad que tiene el éster por el quitosano; a pesar de que la concentración de éster varíe esta tendencia, se mantiene igual en todos los hidrogeles.

Finalmente, de acuerdo con los análisis estadísticos obtenidos se pudo realizar la liberación controlada del acetaminofén para el hidrogel con concentración polimérica de 4 % p/v y una concentración de éster de 70 mM, ya que estos eran los más estables, pero teniendo en cuenta también, que no existía una gran diferencia significativa con los demás, logrando una buena respuesta del hidrogel con el fármaco, mostrando así, que éste puede alcanzar un 96 % de liberación, en un tiempo corto, como fueron las dos primeras horas. Sin embargo, también

se recomienda evaluar, cómo se comportan los otros hidrogeles, variando la concentración del éster, para analizar si se tiene la misma tendencia de liberación.

Referencias:

- [1] R. B. Macea, C. F. De Hoyos, Y. G. Montes, E. M. Fuentes, and J. I. R. Ruiz, “Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero,” *Polimeros*, vol. 25, no. 1, pp. 58–69, Jan. 2015, doi: 10.1590/0104-1428.1558.
- [2] 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,” *Int J Polym Sci*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/9423565.
- [3] G. Michailidou, Z. Terzopoulou, A. Kehagia, A. Michopoulou, and D. N. Bikiaris, “Preliminary Evaluation of 3D Printed Chitosan/Pectin Constructs for Biomedical Applications,” *Mar Drugs*, vol. 19, no. 1, 2021, doi: 10.3390/MD19010036.
- [4] W. C. Chen *et al.*, “The effects of citric acid on thermal and mechanical properties of crosslinked starch film,” *Chem Eng Trans*, vol. 83, 2021, doi: 10.3303/CET2183034.
- [5] P. Sapuła, K. Bialik-Wąs, and K. Malarz, “Are Natural Compounds a Promising Alternative to Synthetic Cross-Linking Agents in the Preparation of Hydrogels?,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 1. 2023. doi: 10.3390/pharmaceutics15010253.
- [6] S. Mongkolkitikul, N. Paradee, and A. Sirivat, “Electrically controlled release of ibuprofen from conductive poly(3-methoxydiphenylamine)/crosslinked pectin hydrogel,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 112, 2018, doi: 10.1016/j.ejps.2017.10.043.
- [7] T. Sato, D. Mello, L. Vasconcelos, A. Valente, and A. Borges, “Chitosan-based coacervate polymers for propolis encapsulation: Release and cytotoxicity studies,” *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 12, 2020, doi: 10.3390/ijms21124561.

- [8] G. Morello, G. De Iaco, G. Gigli, A. Polini, and F. Gervaso, "Chitosan and Pectin Hydrogels for Tissue Engineering and In Vitro Modeling," *Gels*, vol. 9, no. 2, 2023. doi: 10.3390/gels9020132.
- [9] R. Cazorla-Luna *et al.*, "Chitosan-based mucoadhesive vaginal tablets for controlled release of the anti-HIV drug tenofovir," *Pharmaceutics*, vol. 11, no. 1, 2019, doi: 10.3390/pharmaceutics11010020.
- [10] F. A. Kasmi, M. A. Zailani, A. J. A. Bakar, and K. A. M. Amin, "Kinetic release of acetaminophen from cross-linked carrageenan hydrogel for wound dressing application," *J Pure Appl Microbiol*, vol. 14, no. 1, 2020, doi: 10.22207/JPAM.14.1.28.
- [11] M. M. Than, P. Lawanprasert, and S. Jateleela, "Utilization of eggshell powder as excipient in fast and sustained release acetaminophen tablets," *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 39, no. 3–4, 2020.
- [12] A. Abou-Okeil, A. A. Aly, A. Amr, and A. A. F. Soliman, "Biocompatible hydrogel for cartilage repair with adjustable properties," *Polym Adv Technol*, vol. 30, no. 8, 2019, doi: 10.1002/pat.4635.
- [13] P. Pańtak, J. P. Czechowska, E. Cichoń, and A. Zima, "Novel Double Hybrid-Type Bone Cements Based on Calcium Phosphates, Chitosan and Citrus Pectin," *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 17, 2023, doi: 10.3390/ijms241713455.
- [14] F. Naeem *et al.*, "pH Responsive cross-linked polymeric matrices based on natural polymers: Effect of process variables on swelling characterization and drug delivery properties," *BioImpacts*, vol. 7, no. 3, 2017, doi: 10.15171/bi.2017.21.

- [15] Z. Lin, Y. Yang, Z. Liang, L. Zeng, and A. Zhang, "Preparation of chitosan/calcium alginate/bentonite composite hydrogel and its heavy metal ions adsorption properties," *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 11, 2021, doi: 10.3390/polym13111891.
- [16] 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, 2010, doi: 10.1016/j.ejpb.2010.04.013.
- [17] M. Dziadek *et al.*, "Newly crosslinked chitosan- and chitosan-pectin-based hydrogels with high antioxidant and potential anticancer activity," *Carbohydr Polym*, vol. 290, 2022, doi: 10.1016/j.carbpol.2022.119486.
- [18] P. H. Chen *et al.*, "Novel chitosan-pectin composite membranes with enhanced strength, hydrophilicity and controllable disintegration," *Carbohydr Polym*, vol. 82, no. 4, 2010, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.06.057.
- [19] M. Culebras, M. Pishnamazi, G. M. Walker, and M. N. Collins, "Facile tailoring of structures for controlled release of paracetamol from sustainable lignin derived platforms," *Molecules*, vol. 26, no. 6, 2021, doi: 10.3390/molecules26061593.
- [20] 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, 2021, doi: 10.1038/s41598-020-79983-8.
- [21] D. Caccavo *et al.*, "Modeling the modified drug release from curved shape drug delivery systems – Dome Matrix®," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 121, 2017, doi: 10.1016/j.ejpb.2017.08.016.

Anexos

ANEXO A: ESPECTROS PARA UNA CONCENTRACIÓN POLIMÉRICA DE 2%

P/V.

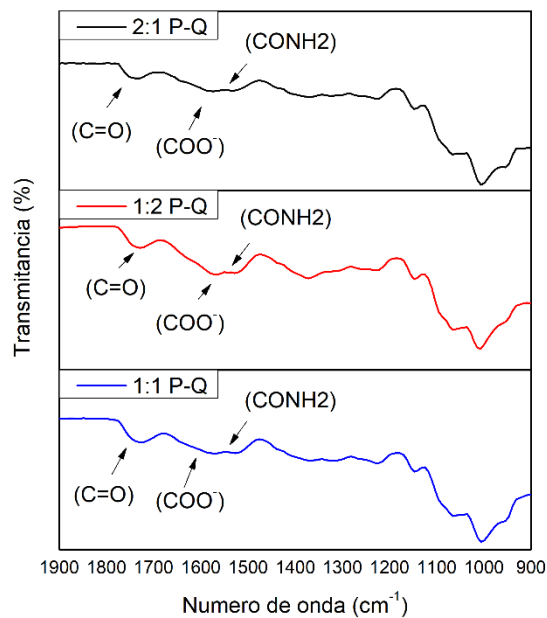


Figura 8. Espectros de FTIR de los hidrogeles de 2% p/v con una concentración de éster de 100mM con sus diferentes proporciones poliméricas.

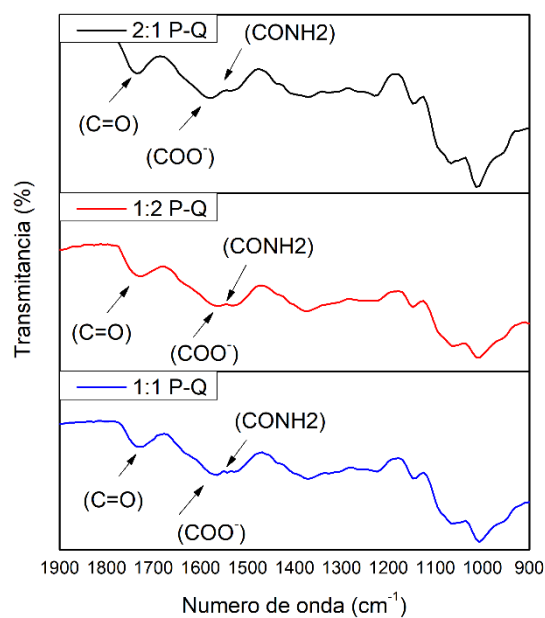


Figura 9. Espectros de FTIR de los hidrogeles de 2% p/v con una concentración de éster de 90mM con sus diferentes proporciones poliméricas.

**ANEXO B: ESPECTROS PARA UNA CONCENTRACIÓN POLIMÉRICA DE 3%
P/V.**

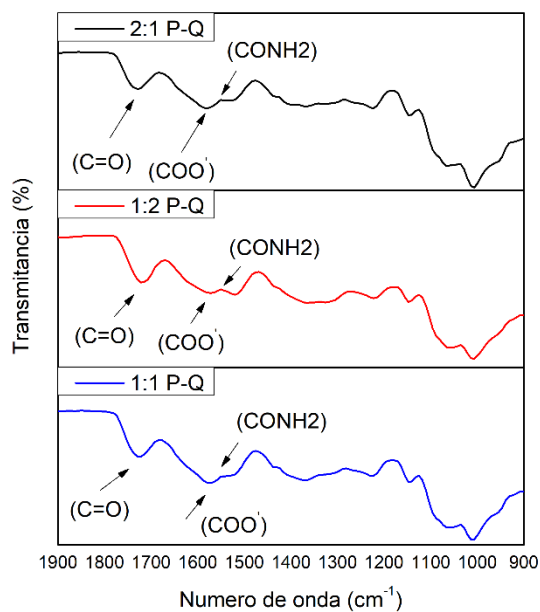


Figura 10. Espectros de FTIR de los hidrogel de 3% p/v con una concentración de éster de 100mM con sus diferentes proporciones poliméricas.

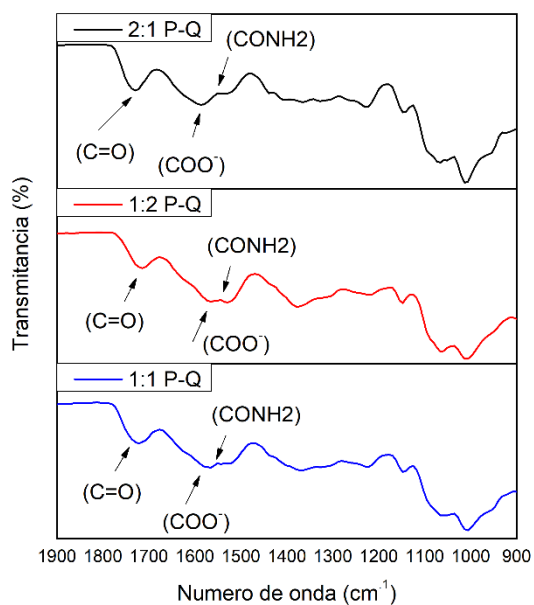


Figura 11. Espectros de FTIR de los hidrogeles de 3% p/v con una concentración de éster de 90mM con sus diferentes proporciones poliméricas.

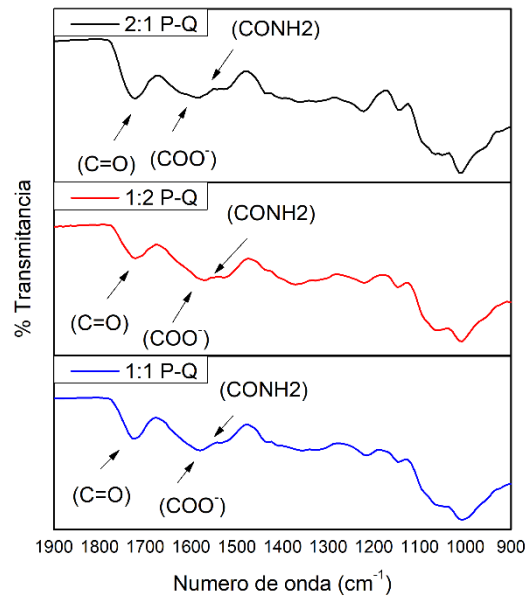


Figura 12. Espectros de FTIR de los hidrogeles de 3% p/v con una concentración de éster de 80mM con sus diferentes proporciones poliméricas.

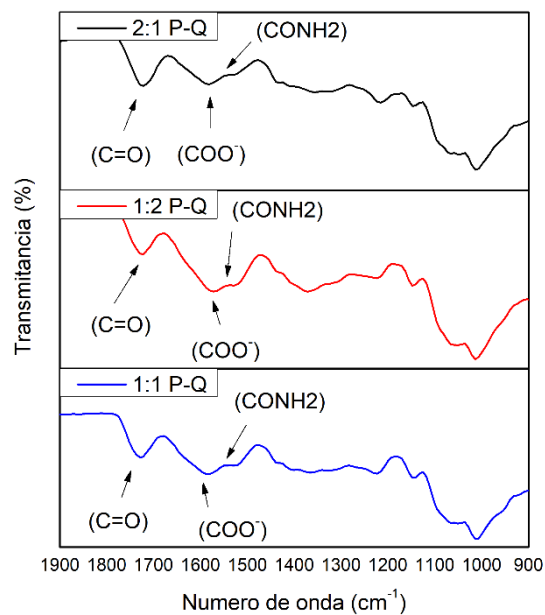


Figura 13. Espectros de FTIR de los hidrogeles de 3% p/v con una concentración de éster de 70mM con sus diferentes proporciones poliméricas.

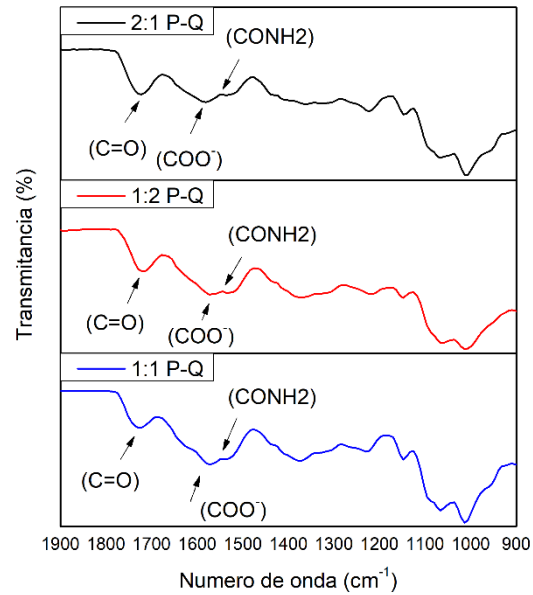
ANEXO C: ESPECTROS PARA UNA CONCENTRACIÓN POLIMÉRICA DE 4%**P/V.**

Figura 14. Espectros de FTIR de los hidrogeles de 4% p/v con una concentración de éster de 100mM con sus diferentes proporciones poliméricas.

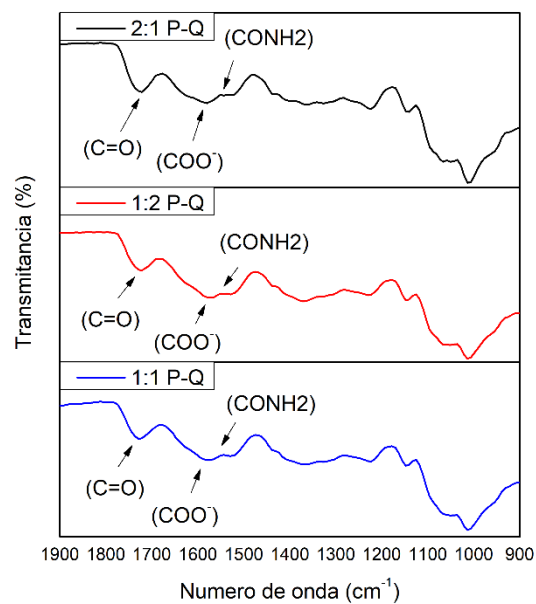


Figura 15. Espectros de FTIR de los hidrogeles de 4% p/v con una concentración de éster de 90mM con sus diferentes proporciones poliméricas.

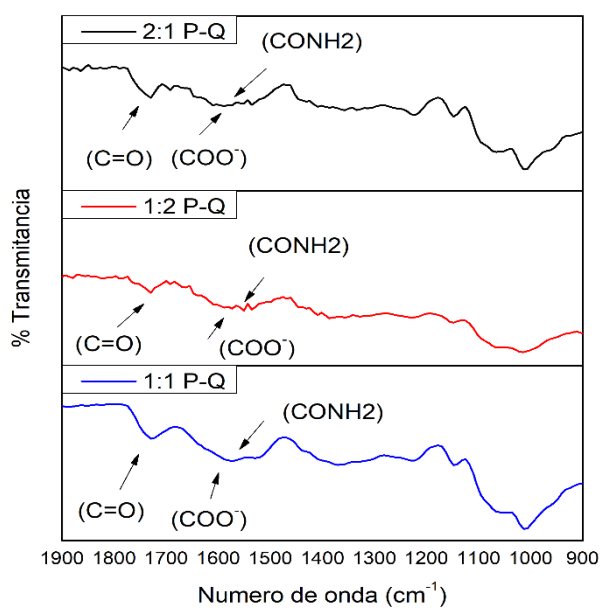


Figura 16. Espectros de FTIR de los hidrogeles de 4% p/v con una concentración de éster de 80mM con sus diferentes proporciones poliméricas.

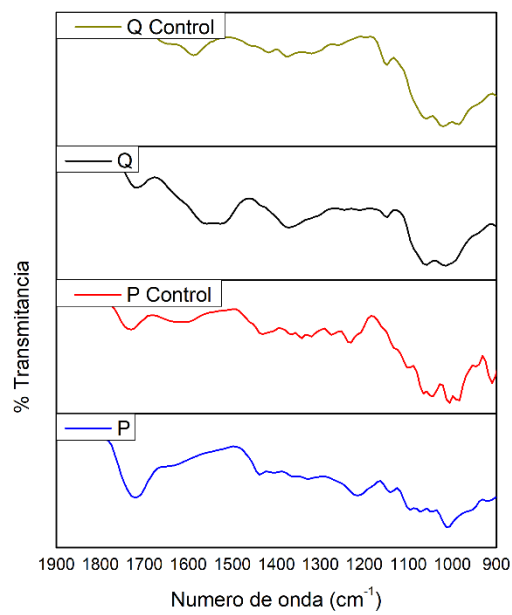
ANEXO D: ESPECTROS PARA PECTINA Y QUITOSANO.

Figura 17. Espectros de FTIR de la Pectina y Quitosano con y sin éster.

**ANEXO E: ESTABILIDAD DE LOS HIDROGELES PARA UNA
CONCENTRACIÓN POLIMÉRICA DE 2% P/V.**

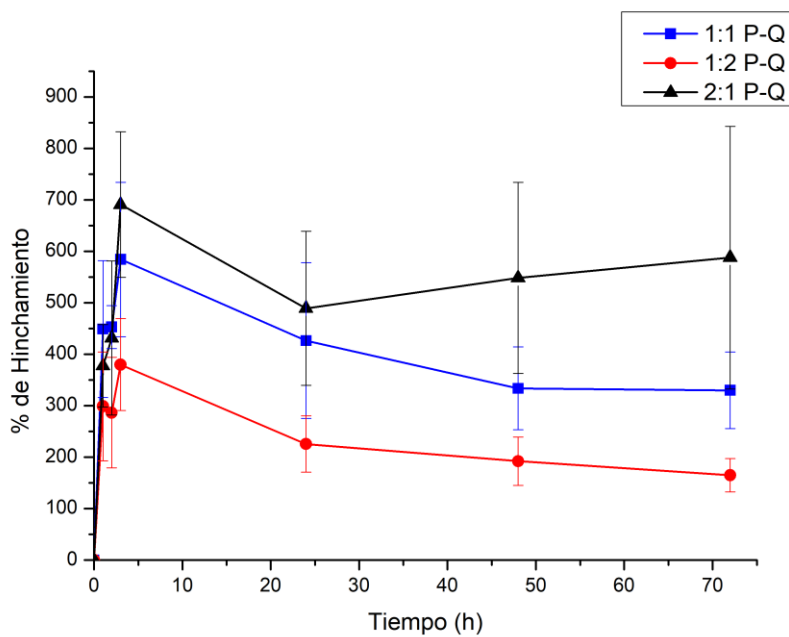


Figura 18. Estabilidad de los hidrogeles de 2% p/v con una concentración de éster de 100mM con sus diferentes proporciones poliméricas.

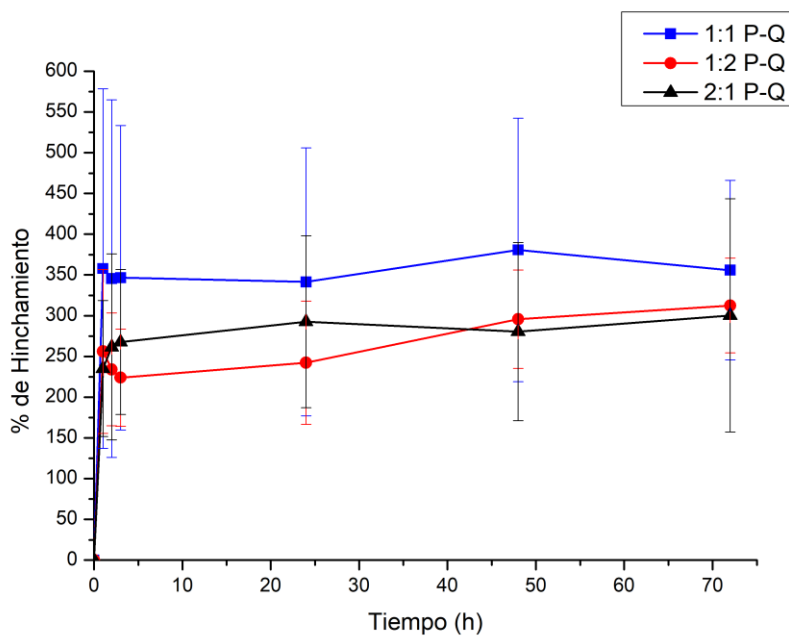


Figura 19. Estabilidad de los hidrogeles de 2% p/v con una concentración de éster de 90mM con sus diferentes proporciones poliméricas.

**ANEXO F: ESTABILIDAD DE LOS HIDROGELES PARA UNA CONCENTRACIÓN
POLIMÉRICA DE 3% P/V.**

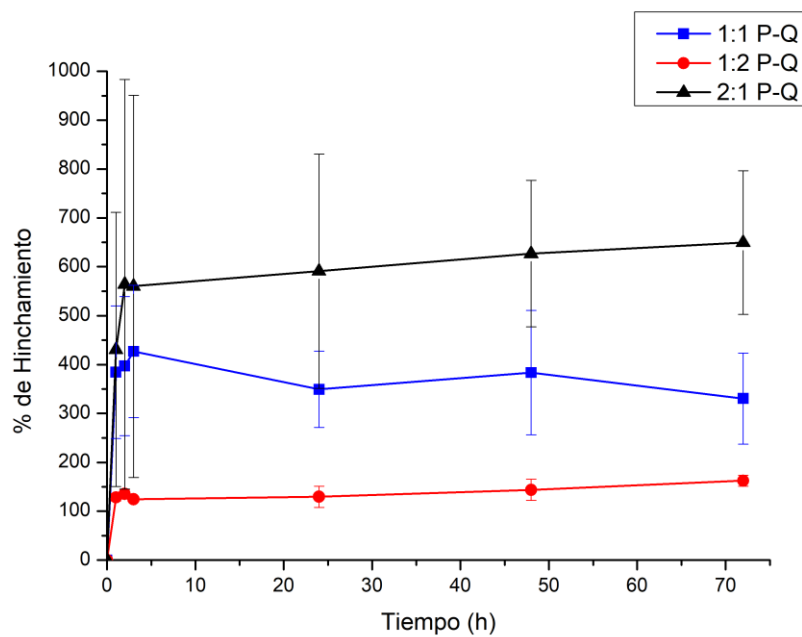


Figura 20. Estabilidad de los hidrogeles de 3% p/v con una concentración de éster de 100mM con sus diferentes proporciones poliméricas.

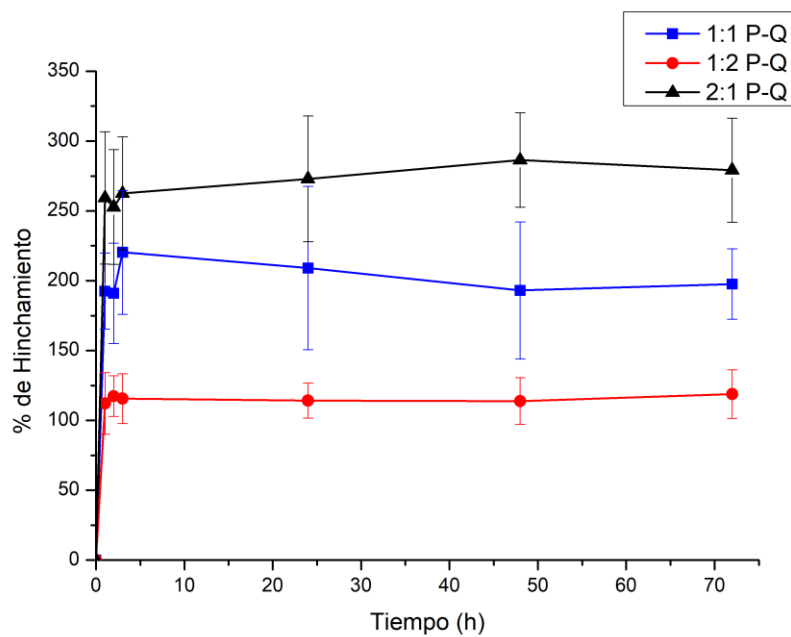


Figura 21. Estabilidad de los hidrogeles de 3% p/v con una concentración de éster de 90mM con sus diferentes proporciones poliméricas.

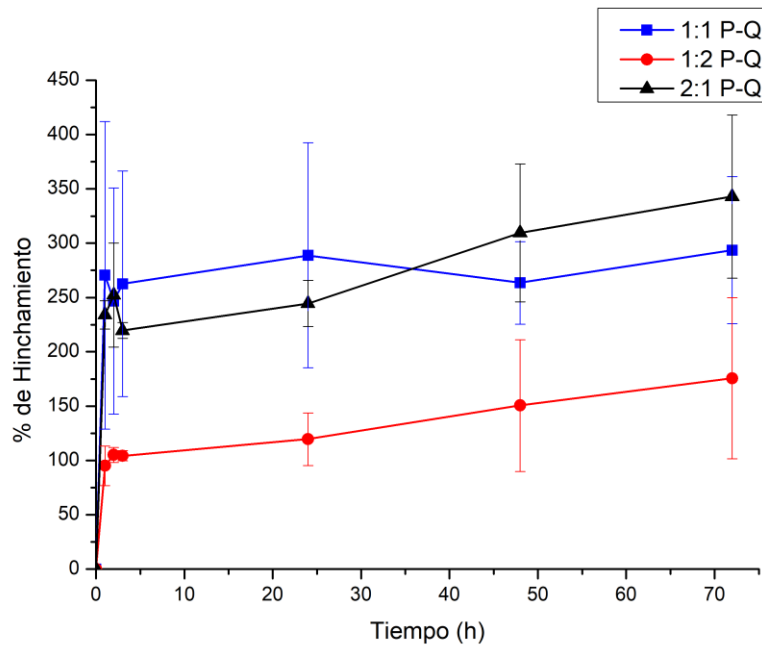


Figura 22. Estabilidad de los hidrogeles de 3% p/v con una concentración de éster de 80mM con sus diferentes proporciones poliméricas.

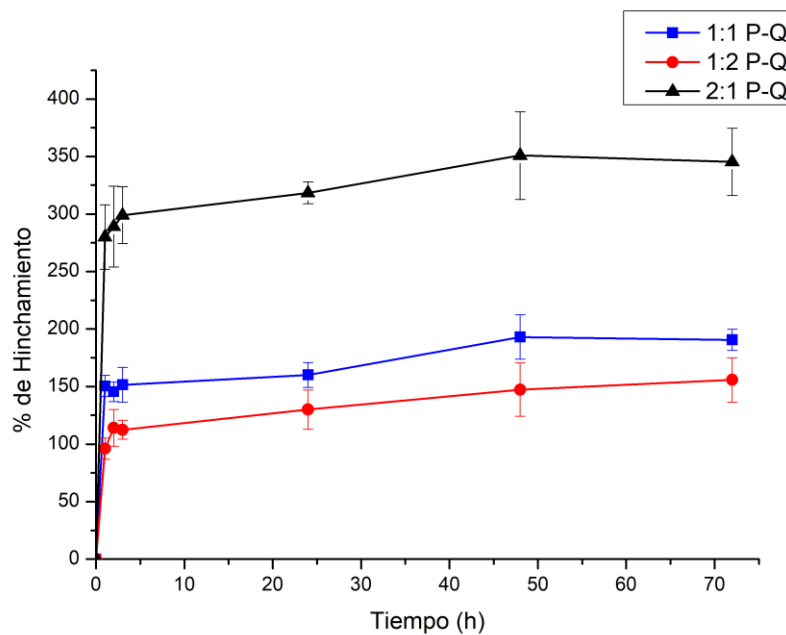


Figura 23. Estabilidad de los hidrogeles de 3% p/v con una concentración de éster de 70mM con sus diferentes proporciones poliméricas.

**ANEXO G: ESTABILIDAD DE LOS HIDROGELES PARA UNA
CONCENTRACIÓN POLIMÉRICA DE 4% P/V.**

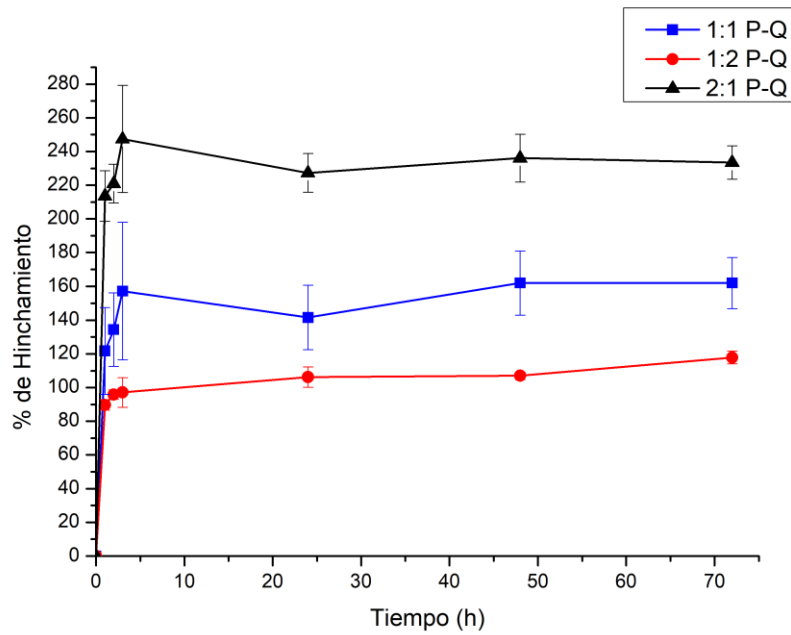


Figura 24. Estabilidad de los hidrogeles de 4% p/v con una concentración de éster de 100mM con sus diferentes proporciones poliméricas.

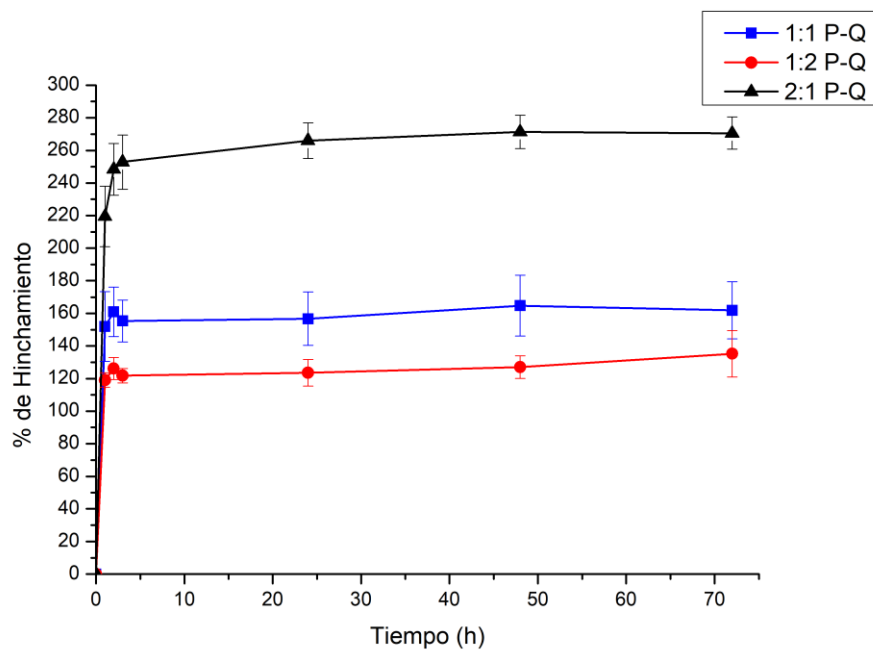


Figura 25. Estabilidad de los hidrogeles de 4% p/v con una concentración de éster de 90mM con sus diferentes proporciones poliméricas.

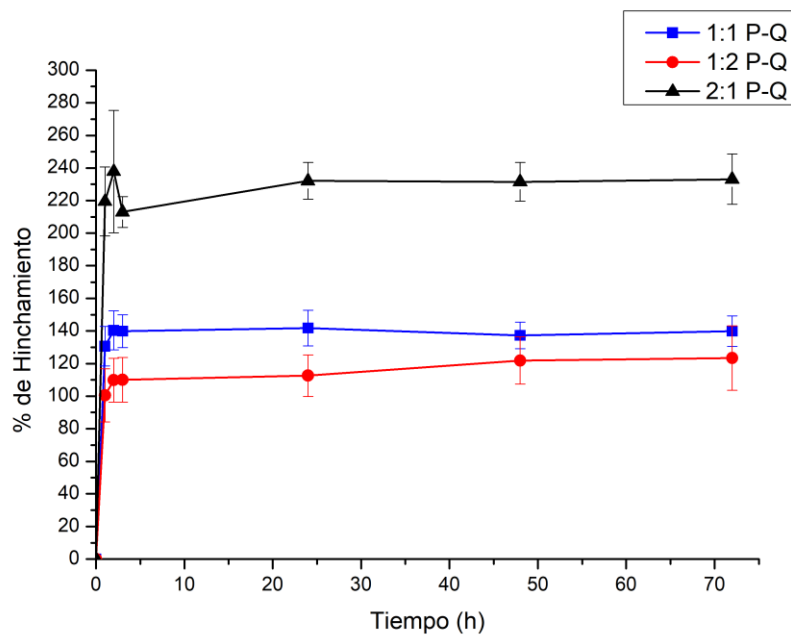
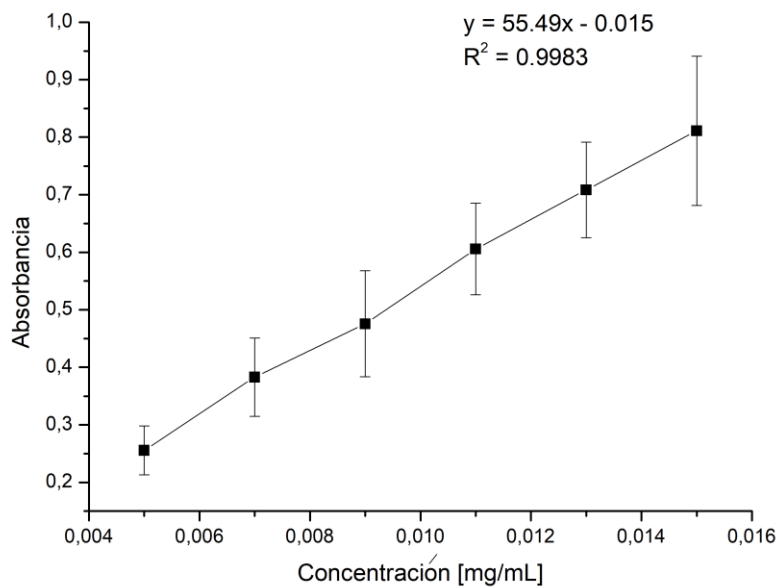


Figura 26. Estabilidad de los hidrogeles de 4% p/v con una concentración de éster de 80mM con sus diferentes proporciones poliméricas.

ANEXO H: CURVA DE CALIBRACIÓN DE ACETAMINOFÉN**Figura 27.** Curva de Calibración de Acetaminofén.

ANEXO I: RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS ANOVA Y TUKEY

I.A Hinchamiento

Comparaciones por parejas de Tukey: PQ

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

<u>PQ</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
2:1	222	309,676	A
1:1	222	256,478	B
1:2	222	166,224	C

Comparaciones por parejas de Tukey: CE

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

<u>CE</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
100	162	302,184	A
80	144	228,961	B
90	216	223,535	B
70	144	221,824	B

Comparaciones por parejas de Tukey: CP

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

<u>CP</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
2,00%	126	321,255	A
3,00%	270	240,974	B
4,00%	270	170,148	C

Comparaciones por parejas de Tukey: PQ*CE

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

<u>PQ*CE</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
2:1 100	54	423,042	A
1:1 100	54	317,704	B
2:1 70	48	290,679	B C
2:1 90	72	265,511	C
1:1 80	48	261,893	B C D
2:1 80	48	259,470	C D
1:1 90	72	237,924	C D
1:1 70	48	208,392	D E
1:2 90	72	167,168	E
1:2 70	48	166,401	E
1:2 100	54	165,805	E
1:2 80	48	165,520	E

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

<u>PQ*CP</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
1:1	42	371,007	A
2,00%			
2:1	90	348,227	A
3,00%			
2:1	42	333,595	A
2,00%			
1:2	42	259,164	B
2,00%			
1:1	90	249,606	B
3,00%			
2:1	90	247,204	B
4,00%			
1:1	90	148,822	C
4,00%			
1:2	90	125,088	C
3,00%			
1:2	90	114,419	C
4,00%			

I.B Liberación de Acetaminofén**Comparaciones por parejas de Tukey: PQ****Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%**

<u>PQ</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
1:1	24	88,2242	A
1:2	24	83,8984	B
2:1	24	81,3069	B

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

<u>t</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
72	9	87,7424	A
48	9	87,6145	A
24	9	87,5419	A
6	9	87,4521	A
5	9	86,7505	A
3	9	86,0221	A
2	9	85,8042	A

1 9 66,8843 B

Comparaciones por parejas de Tukey: PQ*t

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

<u>PQ*t</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
1:1	3	96,4234	A
72			
1:1	3	96,0295	A
48			
1:1 2	3	95,2700	A B
1:1	3	95,2613	A B
24			
1:1 6	3	94,5023	A B
1:1 5	3	94,0152	A B
2:1 1	3	93,7289	A B
1:1 3	3	92,9554	A B
1:2	3	88,6275	A B
72			
1:2	3	87,6472	A B
48			
1:2	3	87,4505	A B
24			
1:2 6	3	87,3121	A B
1:2 3	3	86,1264	A B
1:2 5	3	85,9006	A B
1:2 2	3	82,5358	A B
2:1 6	3	80,5419	A B
2:1 5	3	80,3357	A B
2:1	3	79,9138	A B
24			
2:1 2	3	79,6070	A B
2:1	3	79,1666	A B
48			
2:1 3	3	78,9847	A B
2:1	3	78,1763	A B
72			
1:2 1	3	65,5874	B C
1:1 1	3	41,3364	C

