

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
USFQ**

Colegio de Ciencias e Ingeniería

Parches a base de mecano geles de pectina y quitosano: Efecto de la nanocelulosa tempo oxidada en las propiedades fisicoquímicas y liberación de fármacos.

Nathaly Yolanda Soliz Freire

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 Ingeniería

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

Parches a base de mecano geles de pectina y quitosano: Efecto de la nanocelulosa tempo oxidada en las propiedades fisicoquímicas y liberación de fármacos.

Nathaly Yolanda Soliz Freire

Nombre del profesor, Título académico

**José Álvarez Barreto, PhD
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: Nathaly Yolanda Soliz Freire

Código: 00212038

Cédula de identidad: 1600677908

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UNPUBLISHED DOCUMENT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 presente estudio se analizó el efecto de la nanocelulosa nanofibrilada tempo oxidada (NFTO) en las propiedades fisicoquímicas y de liberación de fármaco de parches de pectina y quitosano. Los protocolos de incorporación de la NFTO se plantearon en función de la homogeneidad del parche, la cual fue evaluada visualmente. Se determinó que el mejor protocolo involucra la mezcla directa en el buffer de acetato de sodio y glicerina utilizando un vortex. Se realizaron análisis SEM, FTIR y TGA, donde se observó la formación de fibras a medida que aumenta la concentración de nanocelulosa.. En el análisis termogravimétrico se visualizó una disminución de temperatura de degradación mientras aumentaba la concentración de NFTO debido a formación de enlaces iónicos observados en el FTIR. En relación a las pruebas de hinchamiento, se obtuvo un menor grado de hinchamiento en hidrogeles con nanocelulosa, lo que implica mejor entrecruzamiento y estabilidad. Adicional, se evaluó la liberación de fármaco en función de la concentración de NFTO, donde no se obtuvo diferencias significativas para las diferentes composiciones. Finalmente, se evaluó la existencia de influencia de NFTO en parches de pectina quitosano, donde se evidenció un mejor entrecruzamiento y estabilidad en condiciones fisiológicas, y liberación de acetaminofén similar.

Palabras claves: hidrogeles, parches, nanocelulosa, nanocelulosa tempo oxidada, pectina, quitosano.

ABSTRACT

The present study aimed to analyze the effect of tempo-oxidized nanofibrillated nanocellulose (NFTO) on the physicochemical and drug release properties of pectin and chitosan patches. NFTO incorporation protocols were proposed based on the homogeneity of the patches, which was evaluated visually. It was determined that the best protocol involves direct mixing in the sodium acetate and glycerin buffer using a vortex. SEM, FTIR and TGA analyzes were carried out, where the formation of fibers was observed as the nanocellulose concentration increased. In the thermogravimetric analysis, a decrease in degradation temperature was observed while the NFTO concentration increased due to the formation of ionic bonds. observed in the FTIR. In relation to the swelling tests, a lower degree of swelling was obtained in hydrogels with nanocellulose, which implies better cross-linking and stability. Additionally, drug release was evaluated as a function of NFTO concentration, where no significant differences were obtained for the different compositions. Finally, the existence of NFTO influence in chitosan pectin patches was evaluated, where better cross-linking and stability under physiological conditions, and similar acetaminophen release, were evident.

Key words: hydrogels, patches, nanocellulose, tempo-oxidized nanocellulose, pectin, chitosan.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. MATERIALES Y METODOLOGÍA	14
2.1 Materiales.....	14
2.2 Elaboración de parches.....	14
2.2.1 Preparación de hidrogeles de pectina y quitosano.....	14
2.3 Caracterización química/física de los parches.....	15
2.3.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas em inglés).	15
2.3.2 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).....	15
2.3.3 Análisis Termogravimétrico (TGA).	15
2.3.4 Prueba de hinchamiento.....	16
2.4 Encapsulación y liberación acetaminofén	16
2.5 Análisis Estadístico	17
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
3.1 Definición del protocolo de incorporación de nanocelulosa	18
3.2 Caracterización química/física parches	19
3.2.1 Morfología parches.....	19
3.2.2 Caracterización química de los parches.....	20
3.2.3 Estabilidad térmica.	22
3.2.4 Estabilidad en condiciones fisiológicas.....	23
3.3 Modelo de liberación de acetaminofén.....	25
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	27

5. REFERENCIAS 29

6. ANEXOS 36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Apariencia de los hidrogeles formados a través de dos protocolos: a) Nanocelulosa liofilizada incorporada en el tratamiento mecánico y b) Nanocelulosa disuelta en buffer	19
Figura 2. Micrografías electrónicas de barrido de parches con una relación pectina quitosano 1:1 a diferentes concentraciones de nanocelulosa: (a) Control, (b) 2% p/p, (c) 3% p/p, (d) 4% p/p, (e) 6% p/p. Magnificación: 100X, barra de calibración:100 μ m ...	20
Figura 3. Espectros FTIR de parches a diferentes concentraciones de nanocelulosa: control, 2%, 3%, 4%, 6%	22
Figura 4. Análisis termogravimétrico de parches a diferentes concentraciones de nanocelulosa: control, 2%, 4%, 6%	23
Figura 5. Cinética de hinchamiento de los parches con distintas concentraciones de nanocelulosa: original, 2%, 3%, 4%, 6%	25
Figura 6. Porcentaje acumulado de liberación de acetaminofén con distintas concentraciones a 37°C en los parches durante 72 horas.	26

1. INTRODUCCIÓN

Los hidrogeles son materiales poliméricos que se caracterizan por formarse a través del entrecruzamiento de redes de polímeros, lo que resulta en estructuras tridimensionales con la capacidad de absorber y retener una gran cantidad de agua [1]. Por lo cual tienen un papel importante en la actualidad debido a su amplia variedad de aplicaciones en diferentes campos, como la biomedicina, la ingeniería de tejidos, la agricultura e industria alimenticia. En la biomedicina, los hidrogeles se utilizan para el desarrollo de vendajes para heridas, implantes, terapias de medicina regenerativa y sistemas de liberación controlada de medicamentos [2].

La liberación controlada de fármacos son formas de dosificación que permiten la liberación del fármaco, a partir de una matriz, a una velocidad y/o en una localización determinadas, para conseguir valores adecuados de biodisponibilidad y garantizar un correcto efecto farmacoterapéutico en el paciente [3]. Además, existen diversas rutas de administración de fármacos, cada una con sus ventajas e inconvenientes, como la vía oral, sublingual, tópica, inhalatoria, intravenosa, intramuscular y transdérmica [4]. Un caso representativo del último incluye los parches transdérmicos, los cuales constan de tres capas esenciales: una cubierta protectora que previene la entrada de partículas externas hacia la herida, y resguarda los otros elementos del parche; una matriz polimérica que alberga el medicamento; y por último, una capa adhesiva que actúa como soporte para mantener el parche adherido a la piel [5]. Entre las ventajas primordiales de la estrategia de administración de fármacos a través de la piel, destacan la reducción de la toxicidad celular gracias a la menor dosis necesaria, la liberación regulada del medicamento, una mayor tolerancia y la minimización de los efectos secundarios. Por otro lado, emplear parches como sistemas para encapsular y liberar medicamentos representa una opción más económica y accesible para las comunidades

rurales que tienen un acceso limitado a instalaciones de atención médica [6]. En el presente trabajo la estructura objeto de estudio será la matriz polimérica en parches transdérmicos.

Como se mencionó anteriormente, los hidrogeles son uno de los principales materiales de desarrollo de estos parches, por lo que la capacidad de liberación está influenciada por la naturaleza del hidrogel, la cual varía en función de su composición y el método de entrecruzamiento. Esto permite que estos materiales sean aptos para mantener una administración prolongada y uniforme de sustancias. En este sentido, los hidrogeles pueden estar formados por uno o varios polímeros, ya sean de origen sintético o natural. Un ejemplo de polímero sintético comúnmente empleado es el alcohol polivinílico (PVA) [7], la carboximetilcelulosa (CMC), la poliacrilamida (PAM) y el polietilenglicol (PEG) [8]. Estos posibilitan que los hidrogeles resultantes tengan una mayor capacidad de absorción de agua, exhiban buenas características mecánicas y disfruten de una vida útil extendida, lo que hace que su utilización sea destacada en comparación con los hidrogeles de origen natural [9]. No obstante, los polímeros de origen natural, tales como el quitosano, la pectina, la celulosa, el colágeno, la queratina, ofrecen otras ventajas importantes, como biodegradabilidad, biocompatibilidad, alta capacidad de mucoadhesividad y su amplia disponibilidad [8]. Su inconveniente reside en su escasa resistencia mecánica y limitada estabilidad; no obstante, es factible realzar la resistencia mecánica, la estabilidad térmica y otros aspectos similares a través de la interconexión y la incorporación de otros polímeros.

La pectina es un polisacárido compuesto por ácido galacturónico y se localiza en la pared celular de las plantas, siendo extraída principalmente de la cáscara de ciertas frutas como manzana, limón, naranja, entre otras [10]. Se debe considerar que la pectina es sensible al pH y a la temperatura [11], además posee una baja capacidad de retención

de agua [12], lo que influye en la formación de hidrogeles estables y durabilidad. Por otra parte, el quitosano es un polisacárido de estructura lineal que está formado por glucosamina y N-acetilglucosamina, se obtiene a través de un proceso de desacetilación que implica la eliminación de los grupos acetilo de la quitina. Este se extrae de la quitina, que es otro polisacárido presente en los exoesqueletos de crustáceos, como cangrejos y camarones [13]. Las principales ventajas de este biopolímero radican en alta capacidad de retención de agua y sus propiedades antimicrobianas [14]. Sin embargo, este material exhibe insolubilidad en agua y soluciones orgánicas, y apenas se disuelve en ambientes ácidos, lo que hace que su utilidad sea limitada [15].

Debido a las restricciones que implica usar un biopolímero puro, se han llevado a cabo la combinación de polímeros entre sí y con otros componentes con la finalidad de incorporar las ventajas inherentes de cada uno de ellos para crear compuestos con mayor bioactividad y mejora de propiedades físicas y químicas [16]. Por ejemplo, se ha reportado que los hidrogeles biodegradables de pectina y quitosano pueden mejorar potencialmente los efectos del tratamiento del cáncer debido a la liberación prolongada de cisplatino citostático [17]. Además, se han realizado films de pectina/quitosano con extracto de fruta noni (NFE) con resultados favorables en las propiedades de tracción y permeabilidad al vapor de agua [18]. También, Calvopiña en 2022 [19] desarrolló parches a base de mecanogeles de quitosano y pectina con potencial aplicación en la encapsulación y administración transdermal de fármaco, en el Laboratorio de Biomateriales de Ingeniería Química en la USFQ. A pesar de todo, los sistemas combinados de pectina y quitosano todavía son inestables en medios fisiológicos y presentan bajas propiedades mecánicas, lo que genera limitaciones de aplicación en partes de alta movilidad física y su producción en masa.

Actualmente, se ha incorporado nanocelulosa en hidrogeles de pectina e hidrogeles de quitosano [20] por separado en aplicaciones biomédicas. La celulosa, que es el biopolímero más comúnmente hallado en fuentes como la madera, experimenta una transformación al ser sometida a oxidación mediante la utilización del radical TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-óxido) [21]. Este proceso conduce a la obtención de un compuesto extremadamente fino, cristalino y caracterizado por una alta relación de aspecto [22]. El procedimiento de oxidación con TEMPO implica la conversión de un hidroxilo presente en la cadena molecular de celulosa a un aldehído o a un grupo carboxilo bajo condiciones de oxidación. Esto conlleva a una disminución en la longitud de la cadena de celulosa, generando microcristales de celulosa a una escala nanométrica, llamado nanocelulosa [23]. Es así, que sus ventajas principales son biodegradabilidad, biocompatibilidad, posee una destacada habilidad para retener agua, lo que la hace idónea en la fabricación de hidrogeles que requieran una elevada capacidad de retención de líquido. Asimismo, presenta notables propiedades mecánicas y térmicas, lo que la convierte en una elección adecuada para aplicaciones que demandan una fuerte resistencia tanto en términos mecánicos como térmicos [24].

De esta manera, el presente trabajo plantea evaluar el efecto de la nanocelulosa tempo oxidada en parches de pectina y quitosano elaborados por mecano química para aplicaciones biomédicas. Para cumplir dicho objetivo, primero se definirá protocolos de incorporación de nanocelulosa en la elaboración de mecanogeles de pectina y quitosano. Luego, se determinará la influencia de diferentes concentraciones de nanocelulosa tempo oxidada en las propiedades físicas y mecánicas de los parches de pectina y quitosano para la mejor relación entre estabilidad y formación del parche. Finalmente, se evaluará la liberación controlada de acetaminofén en los parches de pectina y quitosano modificados con nanocelulosa nanofibrilada tempo oxidada.

2. MATERIALES Y METODOLOGÍA

2.1 Materiales.

Los materiales utilizados en la elaboración de hidrogeles fueron pectina cítrica brasileña (con grado de metoxilación de aproximadamente 69%), quitosano (obtenido de cáscara de camarones con grado de desacetilación $\geq 90\%$) de BiOrigins, nanocelulosa nanofribilada tempo oxidada (concentración de $1.92 \pm 0.03\%$, y grado de oxidación de 16.8%) donada por la profesora Soledad Peresin desde Auburn University, buffer de acetato de sodio (BAS) que contiene glicerol con 99.5% de grado USP y acetato de sodio al 99% de Loba Chemie. Para la liberación de fármacos se añadió acetaminofén estándar (Sigma-Aldrich A3035) en los hidrogeles, y se usó un buffer de fosfato salino (PBS, pH 7.4).

2.2 Elaboración de parches

2.2.1 Preparación de hidrogeles de pectina y quitosano.

Para la preparación de hidrogeles se consideró como base lo expuesto en trabajos previos en el Laboratorio de Biomateriales de la USFQ [25], se realizó una mezcla sólida entre pectina y quitosano relación 1:1 que se sometió durante 15 minutos a tratamiento mecánico usando un pistilo y un mortero [26]. Luego, se mezcló los polímeros mecanizados en relación 3.33% p/v con un buffer de acetato de sodio (1.0 N y pH 2) y glicerina al 5% v/v (temperatura ambiente) durante 30 segundos en un homogenizador. La mezcla homogenizada se colocó en moldes de silicona circulares y se dejó en reposo por 2 horas a temperatura ambiente, y posteriormente, los hidrogeles resultantes se secaron a 40 °C durante 48h (descripción visual en el Anexo A).

2.2.2 Incorporación de nano celulosa en parches de pectina y quitosano.

Una vez establecida la elaboración de los hidrogeles base de pectina y quitosano, se probaron nuevos protocolos de incorporación de la nanocelulosa nanofibrilada tempo oxidada (NFTO) tales como: previa liofilización de NFTO para incorporar durante la mecanización de los biopolímeros, y la incorporación directa en el buffer con agitación en vortex durante 15 segundos previo a la mezcla con los biopolímeros. En el primer procedimiento se obtuvieron como resultado parches heterogéneos (ver sección de Resultados y Discusión) por lo que se seleccionó el segundo protocolo para realizar los parches con variación en la concentración de nano celulosa (2%, 3%, 4%, 6% p/p con respecto al peso de la mezcla polimérica).

2.3 Caracterización química/física de los parches

2.3.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés).

Con la finalidad de estudiar la morfología de los hidrogeles, se realizó microscopía electrónica de barrido en un equipo JEOL JSM-IT300 de muestras de 5 mm² de los parches con diferentes concentraciones de NFTO, que fueron recubiertas con oro mediante el equipo Sputter Coater modelo 108auto de TED PELLA y fijadas en el disco porta muestras a 20 kV y presión de 67 Pa con resoluciones de 100x, 250x.

2.3.2 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).

Se caracterizó los hidrogeles mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR, Agilent Cary 630 con punta de diamante), con un rango de longitud de onda de 648 a 4003 cm⁻¹, y 128 scans.

2.3.3 Análisis Termogravimétrico (TGA).

La técnica de análisis termogravimétrico (TGA) en el equipo STA 8000 de la marca Perkin Elmer se utilizó para estudiar la estabilidad térmica. Las condiciones empleadas correspondieron a flujo de nitrógeno 40 mL/min con un rango de

temperatura entre 25 °C – 650 °C, velocidad de cambio de 10 °C/min y muestras con peso de 8 mg [19].

2.3.4 Prueba de hinchamiento.

En cuanto a la prueba de hinchamiento como indicador de estabilidad, se introdujo muestras de diámetro de 1 cm de los parches en PBS a un pH de 7.4 a 37 °C en incubación, por 72 horas, para simular condiciones corporales humanas [27]. Se pesaron los hidrogeles en seco y a determinados tiempos (1h, 3h, 4h, 5h, 24h, y 72h). El porcentaje de hinchamiento se obtuvo mediante la ecuación a continuación:

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

Donde, m_t es la masa del hidrogel en el tiempo t y m_i es la masa inicial cuando el hidrogel está seco, previo a sumergirlo en PBS

2.4 Encapsulación y liberación acetaminofén

Se realizó la encapsulación del acetaminofén en una relación 5% p/p con respecto a la cantidad de mezcla biopolimérica [28], que se incorporó cuando los biopolimeros ya estaban mecanizados previo a la adición del buffer. Luego, se realizó el mismo protocolo previamente mencionado en la sección 2.1.

Por otra parte, en la liberación se colocaron las muestras de hidrogeles (por triplicado) de 1 cm de diámetro en 5 mL de PBS a 37 °C en la incubadora. Cada determinado tiempo (1, 2, 3, 5, 6, 24, 48, 72)h se tomaron alícuotas de 100 uL de la solución y se sustituyó la misma cantidad con PBS fresco. Luego, se diluyeron las alícuotas hasta 2 mL con PBS y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro CECIL CE 2041 UV-VIS, a una longitud de onda de 243 nm (λ_{max} acetaminofem) [29]. Después se determinó la concentración mediante la curva de calibración (Anexo B)

realizada con soluciones de concentración definidas. Finalmente, se calculó el porcentaje de fármaco liberado mediante[28] :

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

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

2.5 Análisis Estadístico

Los ensayos de hinchamiento y liberación se realizaron por triplicado, reportando los valores como el promedio (\pm desviación estándar). Los efectos significativos se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias significativas fueron por comparación por pares con prueba Tukey, con un 95% de confianza ($p < 0.005$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Definición del protocolo de incorporación de nanocelulosa

Primero se realizaron dos procedimientos de incorporación de la NFTO, donde se pudo observar físicamente diferencias entre los parches (Figura 1). En la figura 1a se observó un parche no homogéneo, principalmente debido a que la nanocelulosa liofilizada no se trituró completamente en el mortero. Esto puede deberse a su alta porosidad, que tiende a tener una baja densidad relacionada con el gran volumen de espacio vacío entre las estructuras porosas [30]. La baja densidad a menudo está asociada con una baja resistencia estructural, lo que significa que las fuerzas mecánicas aplicadas durante el proceso de trituración pueden no ser eficaces para romper o reducir el tamaño de las partículas. Por otra parte, al añadir la NFTO en el buffer de acetato de sodio y glicerol se observó un parche homogéneo, sin presencia de grumos (Figura 1b). Si bien, la solución del acetato de sodio no funciona como solvente para la nanocelulosa, ya que esta muestra una baja solubilidad en la mayoría de los solventes orgánicos y acuosos convencionales debido a su estructura polimérica y a las interacciones intermoleculares presentes [20], la glicerina puede ayudar a mejorar la estabilidad y la dispersión de la nano celulosa debido a su capacidad para formar una interfaz entre la nano celulosa y el medio acuoso [31]. A partir de esto, se obtuvo que el segundo protocolo fue el adecuado para incorporar nanocelulosa en los mecanogeles de quitosano y pectina, con lo cual se realizó la variación de la cantidad de NFTO en los parches. Estos materiales en la siguiente etapa fueron caracterizados como se muestra en la próxima sección.

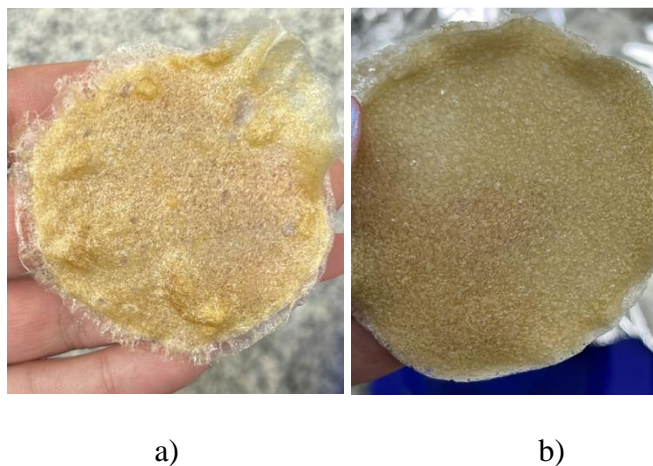


Figura 1. Apariencia de los hidrogeles formados a través de dos protocolos: a) Nanocelulosa liofilizada incorporada en el tratamiento mecánico y b) Nanocelulosa disuelta en buffer

3.2 Caracterización química/física parches

3.2.1 Morfología parches.

La morfología de los hidrogeles se estudió mediante SEM, utilizando el protocolo de incorporación de NFTO en el buffer. En la figura 2, se visualizó los parches de pectina y quitosano en relación 1:1 con variaciones de concentración de nanocelulosa (2, 3, 4 y 6) % con la finalidad de determinar su influencia en los hidrogeles. En el parche control compuesto únicamente por pectina y quitosano, mostrado en la figura 2a, se observaron algunas cavidades circulares, no obstante a medida que la concentración de nanocelulosa aumenta existe el incremento de rugosidades fibrilosas, tal como se observan en las figuras 4b-4e. Esa apariencia se debe a que la NFTO posee una estructura intrínsecamente alargada y fibrosa [32], demostrando que sí ocurrió una incorporación e influencia morfológica de la nanocelulosa en los mecanogeles.

La presencia de estructuras fibrosas en un hidrogel sugiere la existencia de roles importantes en ingeniería de tejidos, liberación controlada de fármacos y otras aplicaciones biomédicas. Estas pueden mejorar significativamente las propiedades mecánicas del hidrogel, haciendo que sea más robusto y resistente, especialmente en aplicaciones que requieren fuerzas mecánicas significativas [33]. También, pueden actuar como reservorios para los fármacos y afectar la velocidad y la cinética de liberación [34], lo cual se evaluará en la sección 3.3.

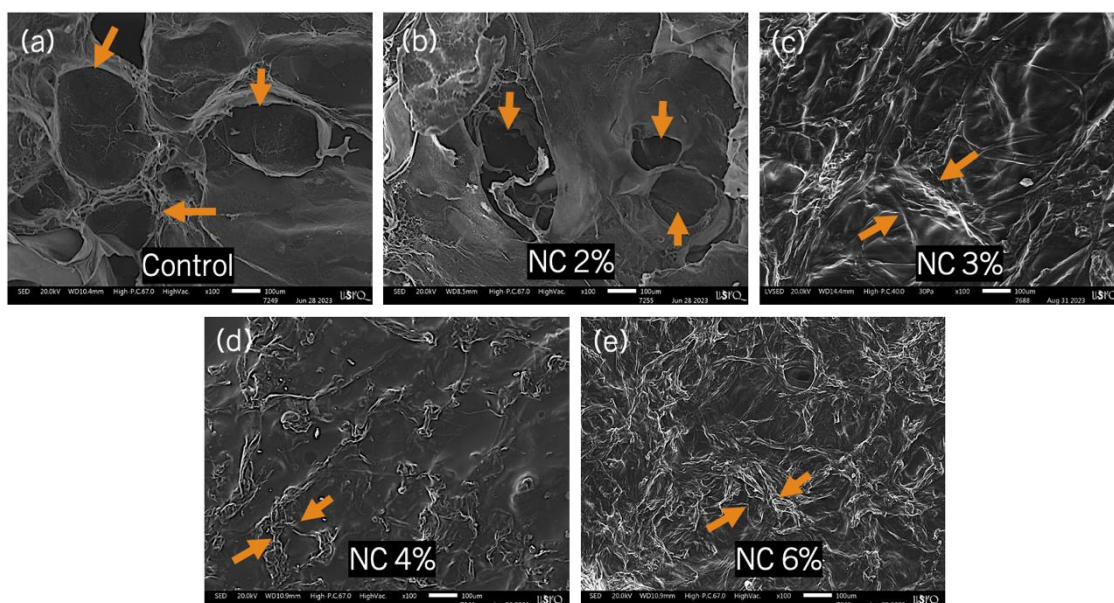
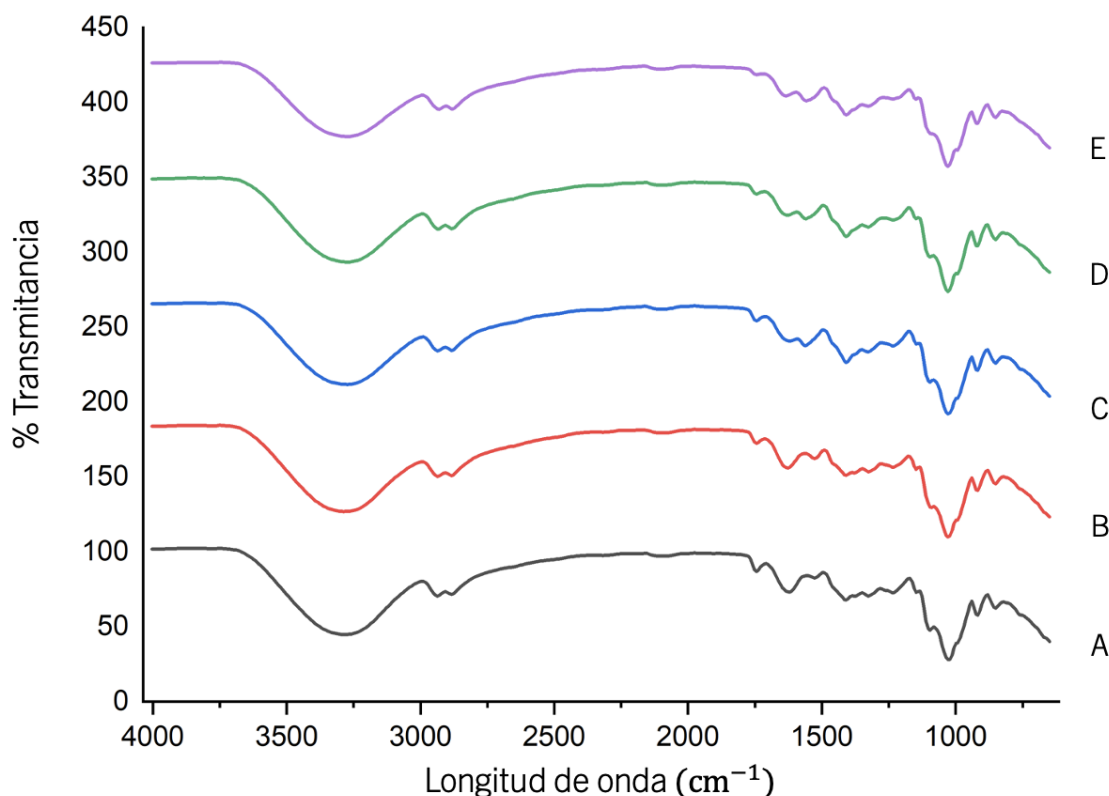


Figura 2. Micrografías electrónicas de barrido de parches con una relación pectina quitosano 1:1 a diferentes concentraciones de nanocelulosa: (a) Control, (b) 2% p/p, (c) 3% p/p, (d) 4% p/p, (e) 6% p/p. Magnificación: 100X, barra de calibración: 100 µm

3.2.2 Caracterización química de los parches.

A continuación se realizó una caracterización química de los parches a diferentes concentraciones de nanocelulosa. En la figura 3 se puede observar en el pico de $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$, que existe una bifurcación a medida que la concentración de la nanocelulosa aumenta, lo que indica la presencia de una interacción molecular

específica [35]. En el caso del quitosano presenta el grupo amida (-CONH-) en ese rango, mientras que la nanocelulosa tempo oxidada posee grupos carboxilato (COO-) que corresponden a un grupo carboxílico desprotonado debido al proceso de oxidación [35]. Ambos grupos funcionales son capaces de formar enlaces de hidrógeno debido a la polaridad de los enlaces O-H y N-H. En otras palabras, el hidrógeno de un grupo -NH de la amida puede formar un enlace de hidrógeno con el oxígeno de un grupo -COO⁻. Así mismo, existe una reducción del estiramiento en $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a enlaces C=O en grupos amida. También se visualizan picos característicos que no cambian como el de pectina $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo éster, bandas $\sim 1420\text{ cm}^{-1}$ relacionados a la deformación angular de grupos metilo en pectina, picos $\sim 1240\text{ cm}^{-1}$ de estiramiento de C-O-C en enlaces éter en pectina, bandas de $\sim 1050\text{ cm}^{-1}$ asignados como enlaces C-O-C de estiramientos en nanocelulosa y enlaces glicosídicos del quitosano.



A:Control B:Nanocelulosa 2% C:Nanocelulosa 3% D:Nanocelulosa 4% E:Nanocelulosa 6%

Figura 3. Espectros FTIR de parches a diferentes concentraciones de nanocelulosa: control, 2%, 3%, 4%, 6%

3.2.3 Estabilidad térmica.

En este estudio, se investigó el comportamiento térmico de parches compuestos por pectina, quitosano y nanocelulosa, centrándose especialmente en la influencia de la concentración de nanocelulosa en la temperatura de máxima degradación. En la figura 4 se puede visualizar que a medida que aumentó la concentración de NFTO, disminuyó la temperatura de máxima degradación de los parches, desde 228 °C hasta 178 °C. Debido a que la temperatura máxima de degradación es indicativa de la estabilidad térmica del material, una disminución en esta implica limitaciones a las aplicaciones prácticas del material en entornos donde se requiere resistencia térmica [36].

Según la bibliografía [35] el punto de degradación de la nanocelulosa tempo oxidada se encuentra entre 275 °C y 350 °C que se da por la ruptura de los enlaces glicosídicos C-O-C, mientras que el quitosano y pectina presentan menores temperaturas (228 °C a 300 °C y 200 °C a 260 °C correspondientemente), y cuando se combinan la pectina y el quitosano tienden a formar complejos iónicos con temperatura de degradación de alrededor de 250 °C [37] . Al añadirle la nanocelulosa tempo oxidada se exhibe una degradación térmica inferior debido a que se forman enlaces iónicos entre los biopolímeros (sobre todo por la introducción de los grupos carboxilatos) que cambian la estructura de las cadenas, lo que probablemente pudo provocar una pérdida de organización y cristalinidad.

Además, comparando con los resultados obtenidos en el SEM, a medida que la concentración de nanocelulosa aumenta, hay mayor formación de fibras, implicando

mayor desorden, una menor cristalinidad y dispersión en los parches [38] que produjo la disminución de temperatura de degradación.

En cuanto al peso remanente, este no presenta una relación proporcional a la concentración de nanocelulosa; este fue mayor cuando se tenía un 2%, y menor cuando hubo un 4% de NFTO. Las posibles explicaciones pueden ser la variada distribución y dispersión de la nanocelulosa en la matriz polimérica [31], o la presencia de impurezas en la NFTO.

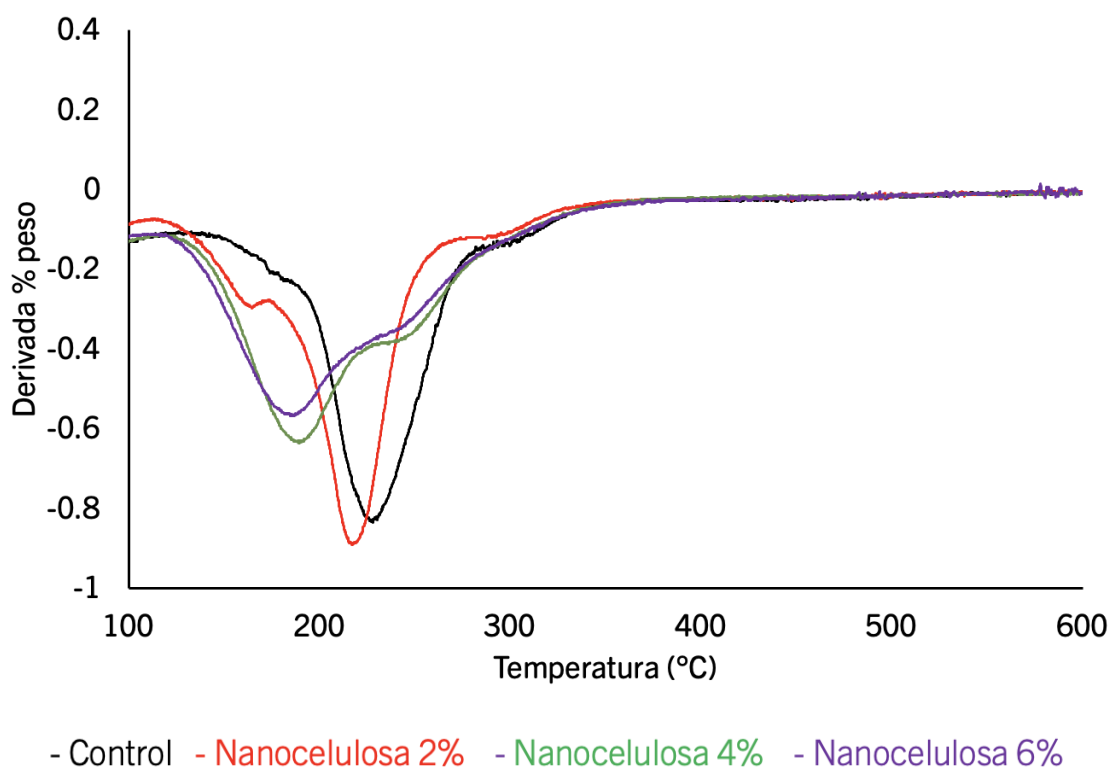


Figura 4. Análisis termogravimétrico de parches a diferentes concentraciones de nanocelulosa: control, 2%, 4%, 6%

3.2.4 Estabilidad en condiciones fisiológicas.

A continuación, se sometieron a los parches a pruebas de hinchamiento con el objetivo de analizar su estabilidad en condiciones fisiológicas. En la figura 5, se observó

que el parche de control y el de 2% de NFTO tuvieron un comportamiento similar porque en las primeras 5 h se dio un incremento de hinchamiento, luego se estabilizó hasta que a las 24 h aumentó otra vez, y es así que su porcentaje de hinchamiento fue alrededor del 450% luego de las 72 h. Sin embargo, a medida que se aumentó la concentración de nanocelulosa, se evidenció un menor hinchamiento de los parches. En especial, el hidrogel con 3% tiene un aumento ligeramente progresivo durante las primeras horas y no existió un cambio brusco a partir de la hora 24, sino que tiende a estabilizarse hasta alrededor de $(209 \pm 8.44)\%$ de hinchamiento. Por último, los hidrogeles de 4% y 6% presentaron un comportamiento parecido, llegando a un hinchamiento de $(150 \pm 13.5)\%$.

En base a estudios previos, se corrobora que mientras menor sea el hinchamiento, menor será la degradación del parche y el grado de entrecruzamiento será mayor [39]. Al comparar con la morfología de los parches previamente analizada, en la figura 2b, con 2% NFTO aún existieron cavidades por lo que el comportamiento de hinchamiento fue similar al parche de control. Mientras que a partir de la figura 2c con 3% de nanocelulosa, se observó el comienzo de la formación de fibras, representando mejor entrecruzamiento y estabilidad. Para confirmar lo antes expuesto, se llevó a cabo un análisis estadístico de ANOVA y de Turkey, donde se clasificó en tres grupos con diferencia significativa entre agrupación, pero no dentro de cada uno: el primero control y nanocelulosa 2%, el segundo nanocelulosa 3% y el último nanocelulosa 4% y 6% (Anexo C).

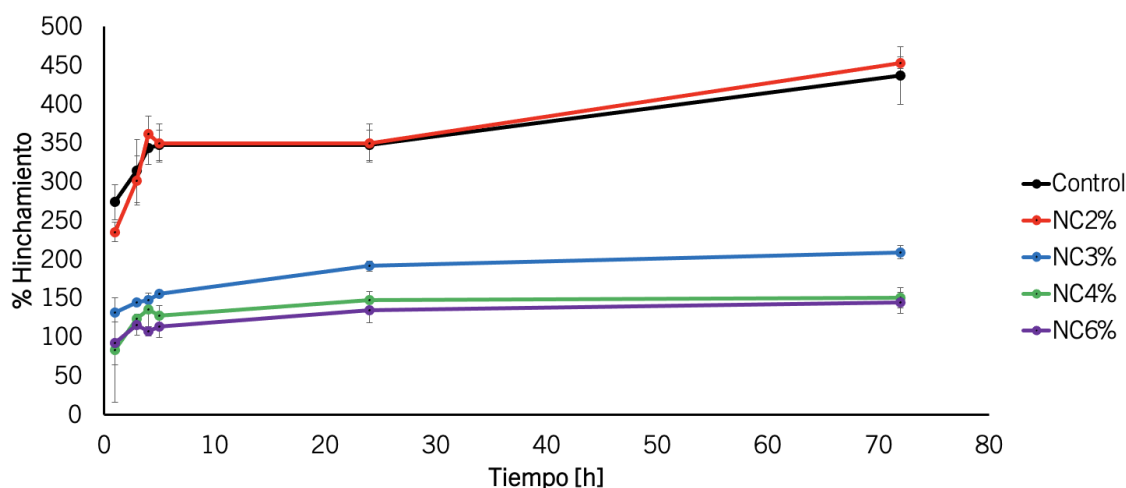


Figura 5. Cinética de hinchamiento de los parches con distintas concentraciones de nano celulosa: original, 2%, 3%, 4%, 6%

3.3 Modelo de liberación de acetaminofén

Los sistemas de liberación de fármacos, como los parches, deberían exhibir preferiblemente una liberación estable. Esto posibilita una utilización más eficaz del medicamento y facilita la administración de dosis menos frecuentes, lo que contribuye a mejorar la conformidad del paciente [3]. Por tanto, resulta crucial tener en cuenta los perfiles de liberación del fármaco. Para llevar a cabo la liberación del fármaco se seleccionaron los siguientes hidrogeles: Control, nc 2%, nc 3% y nc 4%. El de 6% de nanocelulosa fue descartado debido a que no fue significativamente diferente al de 4% en las pruebas de hinchamiento.

Se observa en la figura 6 que generalmente todas las curvas presentan un comportamiento inestable porque al inicio se libera la mayor parte del fármaco y después de las 6h existieron oscilaciones de crecimiento y decrecimiento hasta llegar a la estabilización. Si bien los parches de control tuvieron picos más pronunciados y mayor desviación estándar que los parches con nanocelulosa, se obtuvo mediante ANOVA y Tukey que el porcentaje de liberación no fue estadísticamente distinto para

el porcentaje de concentración y que solo el tiempo si presenta un efecto significativo (Anexo D).

Adicional, lo máximo de liberación que se obtuvo es de alrededor del 17% en el parche de nanocelulosa 4%, que en comparación con estudios anteriores donde la liberación era superior al 60%, se tuvo un porcentaje relativamente bajo [40]. Esto puede explicarse debido a que la nanocelulosa podría interactuar de manera diferente con el acetaminofén o con otros componentes del hidrogel, afectando la liberación del fármaco [41]. La nanocelulosa tempo oxidada suele tener grupos químicos oxigenados en su superficie, como carboxilos. Estos grupos pueden interactuar con el acetaminofén a través de enlaces químicos, como enlaces de hidrógeno.

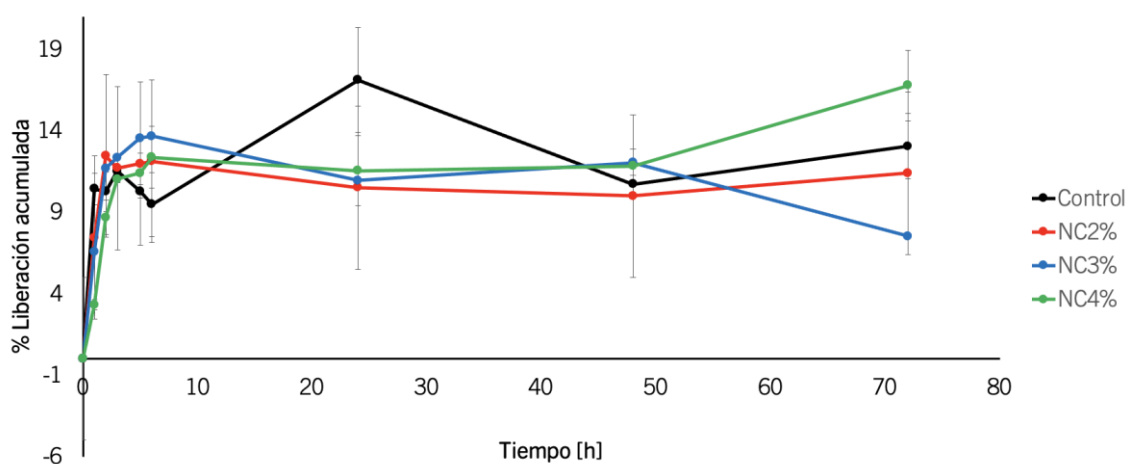


Figura 6. Porcentaje acumulado de liberación de acetaminofén con distintas concentraciones a 37°C en los parches durante 72 horas.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se evaluó el efecto de la nanocelulosa nanofibrilada tempo oxidada en parches de pectina y quitosano elaborados por mecano química para aplicaciones biomédicas. Para esto se logró la obtención de un parche homogéneo visiblemente cuando se introduce nanocelulosa en el buffer de acetato de sodio y glicerina, quedando establecido el protocolo de incorporación de la NFTO. Además, que mediante el SEM se comprobó la formación de estructuras fibrosas a medida que aumenta la concentración de NFTO, generando un mejor entrecruzamiento y flexibilidad.

Al realizar el FTIR no se observaron grandes cambios con la variación de la concentración de nanocelulosa, solo existe bifurcación en el pico de $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$ que indicó formación de enlace de hidrógeno del grupo -NH de la amida del quitosano con el grupo -COO⁻ de la NFTO. Mientras, que en el TGA se dió una disminución de la temperatura de degradación a medida que se aumenta la nanocelulosa debido a la menor cristalinidad y dispersión por las interacciones iónicas existentes en el complejo pectina-quitosano mencionadas anteriormente.

Del mismo modo, si bien se visualizó menores cambios en el porcentaje de liberación de acetaminofén al trascurso de las horas en los parches con nanocelulosa en comparación con los que no poseen, no se diferenció significativamente entre ellos según los análisis estadísticos.

Por otra parte, las pruebas de hinchamiento evidenciaron resultados positivos porque a medida que se aumenta la concentración de nanocelulosa se observó un menor hinchamiento de los parches, lo que implica que la degradación del parche será menor y el grado de entrecruzamiento será mayor. Finalmente se recomienda realizar estudios

mecánicos a profundidad como pruebas de tracción con el fin de evaluar la resistencia a la deformación y fuerza máxima que el material puede soportar antes de romperse.

5. REFERENCIAS

- [1] W. Wang, R. Narain, and H. Zeng, “Hydrogels,” in *Polymer Science and Nanotechnology: Fundamentals and Applications*, Elsevier, 2020, pp. 203–244. doi: 10.1016/B978-0-12-816806-6.00010-8.
- [2] C. Sandoval-Yañez, L. Escobar, and C. A. Amador, “The advantages of polymeric hydrogels in calcineurin inhibitor delivery,” *Processes*, vol. 8, no. 11. MDPI AG, pp. 1–18, Nov. 01, 2020. doi: 10.3390/pr8111331.
- [3] K. K. Jain, “An Overview of Drug Delivery Systems,” in *Methods in Molecular Biology*, vol. 2059, Humana Press Inc., 2020, pp. 1–54. doi: 10.1007/978-1-4939-9798-5_1.
- [4] U. De *et al.*, “SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS OBTENIDOS POR IMPRESIÓN 3D. MECANISMOS DE LIBERACIÓN Y FACTORES QUE INFLUYEN ALBERTO MUÑOZ CARACUEL LA NANOTECNOLOGÍA COMO HERRAMIENTA PARA EL TRANSPORTE DE FÁRMACOS AL CEREBRO LA NANOTECNOLOGÍA COMO HERRAMIENTA PARA EL TRANSPORTE DE FÁRMACOS AL CEREBRO.”
- [5] O. A. Al Hanbali, H. M. S. Khan, M. Sarfraz, M. Arafat, S. Ijaz, and A. Hameed, “Transdermal patches: Design and current approaches to painless drug delivery,” *Acta Pharmaceutica*, vol. 69, no. 2. Sciendo, pp. 197–215, Jun. 01, 2019. doi: 10.2478/acph-2019-0016.
- [6] M. Isaac and C. Holvey, “Transdermal patches: The emerging mode of drug delivery system in psychiatry,” *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, vol. 2, no. 6. pp. 255–263, 2012. doi: 10.1177/2045125312458311.

- [7] A. Hilal, A. Florowska, and M. Wroniak, “Binary Hydrogels: Induction Methods and Recent Application Progress as Food Matrices for Bioactive Compounds Delivery—A Bibliometric Review,” *Gels*, vol. 9, no. 1. MDPI, Jan. 01, 2023. doi: 10.3390/gels9010068.
- [8] N. Kalai Selvan, T. S. Shanmugarajan, and V. N. V. A. Uppuluri, “Hydrogel based scaffolding polymeric biomaterials: Approaches towards skin tissue regeneration,” *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 55. Editions de Sante, Feb. 01, 2020. doi: 10.1016/j.jddst.2019.101456.
- [9] E. M. Ahmed, “Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review,” *Journal of Advanced Research*, vol. 6, no. 2. Elsevier B.V., pp. 105–121, 2015. doi: 10.1016/j.jare.2013.07.006.
- [10] R. Singh, S. Gautam, B. Sharma, P. Jain, and K. D. Chauhan, “Biopolymers and their classifications,” in *Biopolymers and their Industrial Applications*, Elsevier, 2021, pp. 21–44. doi: 10.1016/b978-0-12-819240-5.00002-x.
- [11] F. V. Vityazev *et al.*, “Pectin–glycerol gel beads: Preparation, characterization and swelling behaviour,” *Carbohydr Polym*, vol. 238, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116166.
- [12] S. Groult, S. Buwalda, and T. Budtova, “Pectin hydrogels, aerogels, cryogels and xerogels: Influence of drying on structural and release properties,” *Eur Polym J*, vol. 149, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2021.110386.
- [13] M. T. Martinez, “Desarrollo y aplicaciones de hidrogeles para la administración y liberación modificada de fármacos,” Doctorado, Universidad de Valencia, Valencia, 2016.

- [14] G. Crini, “Historical review on chitin and chitosan biopolymers,” *Environmental Chemistry Letters*, vol. 17, no. 4. Springer Verlag, pp. 1623–1643, Dec. 01, 2019. doi: 10.1007/s10311-019-00901-0.
- [15] A. Sánchez, M. Sibaja B, J. Vega-Baudrit, and S. Madrigal, “Revista iberoamericana de Polímeros Volumen 8(4), Septiembre de 2007 Sánchez et al. Hidrogeles de quitosano SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO OBTENIDO A PARTIR DEL CAMARÓN LANGOSTINO (Pleuroncodes planipes) CON POTENCIALES APLICACIONES BIOMEDICAS,” 2007.
- [16] T. K. Giri, A. Thakur, A. Alexander, Ajazuddin, H. Badwaik, and D. K. Tripathi, “Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: Present status and applications,” *Acta Pharmaceutica Sinica B*, vol. 2, no. 5. Chinese Academy of Medical Sciences, pp. 439–449, 2012. doi: 10.1016/j.apsb.2012.07.004.
- [17] O. Phonrachom, P. Charoensuk, K. Kiti, N. Saichana, P. Kakumyan, and O. Suwantong, “Potential use of propolis-loaded quaternized chitosan/pectin hydrogel films as wound dressings: Preparation, characterization, antibacterial evaluation, and in vitro healing assay,” *Int J Biol Macromol*, vol. 241, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124633.
- [18] R. R. Vildanova, S. F. Petrova, S. V. Kolesov, and V. V. Khutoryanskiy, “Biodegradable Hydrogels Based on Chitosan and Pectin for Cisplatin Delivery,” *Gels*, vol. 9, no. 4, Apr. 2023, doi: 10.3390/gels9040342.
- [19] K. Marcela and C. Esparza, “Parches a base de mecanogeles de quitosano y pectina con potencial aplicación en la encapsulación y administración

- transdermal de fármacos.,” Proyecto de grado, Universidad San Francisco de Quito, Quito, 2022.
- [20] M. Fardioui, A. Qaiss, and R. Bouhfid, “Hydrogels Based on Nanocellulose and Chitosan: Preparation, Characterization, and Properties,” in *Nanocellulose and Nanohydrogel Matrices: Biotechnological and Biomedical Applications*, Wiley Blackwell, 2017, pp. 125–138. doi: 10.1002/9783527803835.ch6.
- [21] M. Jawaid, “Nanocellulose and Nanohydrogel Matrices,” 2017.
- [22] M. Angélica, C. Cruz, A. : Johana, and H. Orjuela, “Hidrogel a base de Nanocelulosa TEMPO oxidada y Nps de ácido tánico oxidado con propiedades regenerativas y antibacteriales. Hidrogel a base de Nanocelulosa TEMPO oxidada y Nanopartículas de ácido tánico oxidado con propiedades regenerativas y antibacteriales.”
- [23] A. Isogai, T. Saito, and H. Fukuzumi, “TEMPO-oxidized cellulose nanofibers,” *Nanoscale*, vol. 3, no. 1. pp. 71–85, Jan. 2011. doi: 10.1039/c0nr00583e.
- [24] S. Liu, Z. X. Low, Z. Xie, and H. Wang, “TEMPO-Oxidized Cellulose Nanofibers: A Renewable Nanomaterial for Environmental and Energy Applications,” *Advanced Materials Technologies*, vol. 6, no. 7. John Wiley and Sons Inc, Jul. 01, 2021. doi: 10.1002/admt.202001180.
- [25] D. Rodríguez, “Combinación de micropartículas de cera de abeja e hidrogeles a base de pectina y quitosano para la liberación controlada de ibuprofeno como fármaco modelo,” Universidad San Francisco de Quito, Quito, 2023. [Online]. Available: <http://bit.ly/COPETHeses>.
- [26] Stacey Andrés Borja, “Elaboración de hidrogeles con base en el entrecruzamiento entre pectina extraída de 3 frutas y quitosano para la liberación controlada de una

- proteína modelo,” Proyecto de titulación, Universidad San Francisco de Quito, Quito, 2019.
- [27] E. J. W. Van Someren, “Age-Related changes in thermoreception and thermoregulation,” in *Handbook of the Biology of Aging*, Elsevier Inc., 2011, pp. 463–478. doi: 10.1016/B978-0-12-378638-8.00022-1.
- [28] 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.
- [29] C. M. García Peña, T. Yanet Montes de Oca Porto, and S. Salomón Izquierdo, “Control de la calidad y estudio de estabilidad del paracetamol gotas orales 100 mg/ml Quality control and stability study of 100 mg/ml paracetamol oral drops,” 2013. [Online]. Available: <http://scielo.sld.cu><http://scielo.sld.cu>
- [30] M. Laura Balquinta, S. C. Andrés, P. Cerrutti, G. Lorenzo, and A. N. Califano, “EFECTO DE LAS CONDICIONES DE PROCESAMIENTO SOBRE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS Y ESTRUCTURALES DE NANOCELULOSA BACTERIANA LIOFILIZADA.”
- [31] J. César, V. Muñoz, and O. Valerio González, “DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES COMPUESTOS POLÍMERO-NANOCELULOSA.”
- [32] A. Serra, I. González, H. Oliver-Ortega, Q. Tarrès, M. Delgado-Aguilar, and P. Mutjé, “Reducing the amount of catalyst in TEMPO-oxidized cellulose nanofibers: Effect on properties and cost,” *Polymers (Basel)*, vol. 9, no. 11, Oct. 2017, doi: 10.3390/polym9110557.

- [33] H. M. Gonzales Molfino, A. Alcalde Yañez, V. V. Valverde Morón, and D. V. Villanueva Salvatierra, “Electrospinning: Advances and applications in the field of biomedicine,” *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, vol. 20, no. 4, pp. 706–713, Sep. 2020, doi: 10.25176/rfmh.v20i4.3004.
- [34] C. Gonzalez, “HIDROGELES PARA LA LIBERACIÓN SOSTENIDA DE FÁRMACOS,” Universidad Complutense, 2019.
- [35] D. Andrea, J. Uribe, H. P. Cordero, and C. Falcón Beas, “PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES INTELIGENTES RESPONSIVOS A CAMPOS MAGNÉTICOS MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERA QUIMICA,” Proyecto de titulacion, Universidad de Chile, Santiago de Chile, 2020.
- [36] L. Hang Kuen, “Effect of Thermal Degradation on Polymer Thermal Properties,” 2015. [Online]. Available: www.tainstruments.com/
- [37] V. B. V. Maciel, C. M. P. Yoshida, and T. T. Franco, “Chitosan/pectin polyelectrolyte complex as a pH indicator,” *Carbohydr Polym*, vol. 132, pp. 537–545, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.06.047.
- [38] S. Kumar and J. Koh, “Physiochemical, optical and biological activity of chitosan-chromone derivative for biomedical applications,” *Int J Mol Sci*, vol. 13, no. 5, pp. 6102–6116, 2012, doi: 10.3390/ijms13056102.
- [39] M. Dziadek *et al.*, “Newly crosslinked chitosan- and chitosan-pectin-based hydrogels with high antioxidant and potential anticancer activity,” *Carbohydr Polym*, vol. 290, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.carbpol.2022.119486.
- [40] G. Quimbiamba, “Formación de hidrogeles de pectina y quitosano utilizando ácido succínico como agente entrecruzante para la liberación controlada de

acetaminofén,” Proyecto de titulación, Universidad San Francisco de Quito, Quito, 2022.

- [41] K. L. O’donnell, G. S. Oporto-Velásquez, and N. Comolli, “Evaluation of acetaminophen release from biodegradable poly (Vinyl alcohol) (PVA) and nanocellulose films using a multiphase release mechanism,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 2, Feb. 2020, doi: 10.3390/nano10020301.

6. ANEXOS

Anexo A: Representación Visual de Protocolos: A) NFTO liofilizada, B) NFTO en buffer

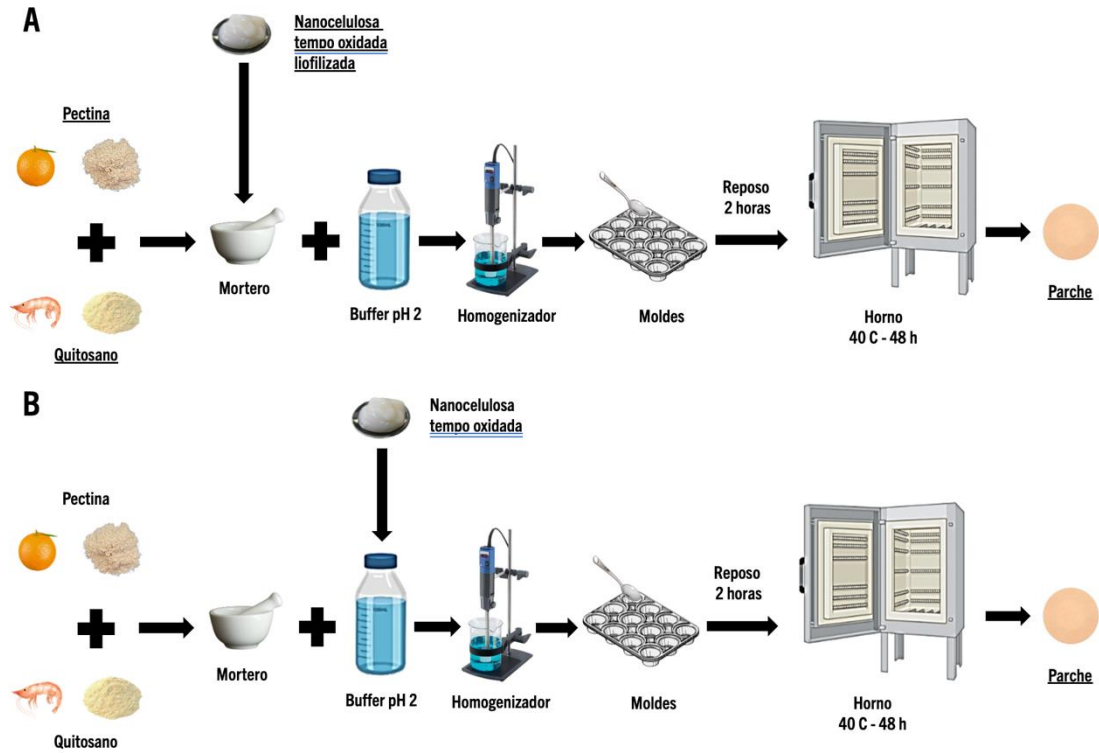


Figura 7. Representación visual de protocolos de incorporación de NFTO

Anexo B: Tabla y gráfico de curva de calibración acetaminofén

Tabla 1. Datos de concentración y absorrbancia de curva de calibración de acetaminofén

Concentración [mg/ml]	Absorbancia
0.005	0.256
0.007	0.383
0.009	0.476
0.011	0.606
0.013	0.708
0.015	0.811

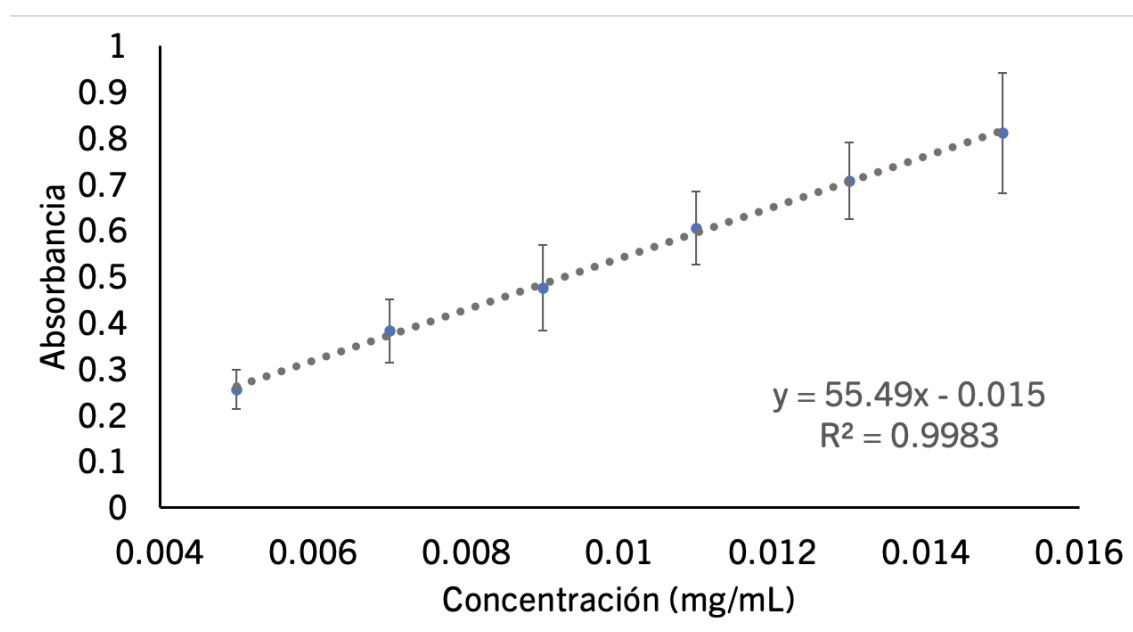


Figura 8. Curva de calibración de acetaminofén

Anexo C: ANOVA y Tukey para pruebas de hinchamiento

Modelo lineal general: % Hinchamiento vs. Concentración NC; Tiempo (h)

Método

Codificación de factores (-1; 0; +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles Valores
Concentración NC	Fijo	5 0,00%; 2,00%; 3,00%; 4,00%; 6,00%
Tiempo (h)	Fijo	6 1; 3; 4; 5; 24; 72

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Concentración NC	4	935845	233961	575,79	0,000
Tiempo (h)	5	104910	20982	51,64	0,000
Concentración NC*Tiempo (h)	20	41261	2063	5,08	0,000
Error	60	24380	406		
Total	89	1106397			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
20,1577	97,80%	96,73%	95,04%

Coeficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	219,42	2,12	103,26	0,000	
Concentración NC					
0,00%	124,52	4,25	29,30	0,000	1,60
2,00%	122,57	4,25	28,84	0,000	1,60
3,00%	-56,09	4,25	-13,20	0,000	1,60
4,00%	-89,31	4,25	-21,02	0,000	1,60
Tiempo (h)					
1	-53,42	4,75	-11,24	0,000	1,67
3	-19,62	4,75	-4,13	0,000	1,67
4	-0,18	4,75	-0,04	0,970	1,67
5	-0,82	4,75	-0,17	0,864	1,67
24	14,52	4,75	3,06	0,003	1,67
Concentración NC*Tiempo (h)					
0,00% 1	-16,66	9,50	-1,75	0,085	2,67
0,00% 3	-10,16	9,50	-1,07	0,289	2,67
0,00% 4	0,25	9,50	0,03	0,979	2,67
0,00% 5	3,97	9,50	0,42	0,678	2,67
0,00% 24	-11,37	9,50	-1,20	0,236	2,67
2,00% 1	-53,35	9,50	-5,61	0,000	2,67
2,00% 3	-20,63	9,50	-2,17	0,034	2,67
2,00% 4	20,26	9,50	2,13	0,037	2,67
2,00% 5	8,56	9,50	0,90	0,372	2,67
2,00% 24	-6,78	9,50	-0,71	0,478	2,67
3,00% 1	21,58	9,50	2,27	0,027	2,67
3,00% 3	0,62	9,50	0,07	0,948	2,67
3,00% 4	-15,54	9,50	-1,64	0,107	2,67
3,00% 5	-6,64	9,50	-0,70	0,488	2,67
3,00% 24	13,61	9,50	1,43	0,157	2,67

4,00% 1	20,86	9,50	2,20	0,032	2,67
4,00% 3	12,71	9,50	1,34	0,186	2,67
4,00% 4	5,13	9,50	0,54	0,592	2,67
4,00% 5	-1,85	9,50	-0,19	0,846	2,67
4,00% 24	2,43	9,50	0,26	0,799	2,67

Ecuación de regresión

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Hinchamiento} = & 219,42 + 124,52 \text{ Concentración NC}_{0,00\%} \\
 & + 122,57 \text{ Concentración NC}_{2,00\%} \\
 & - 56,09 \text{ Concentración NC}_{3,00\%} - 89,31 \text{ Concentración NC}_{4,00\%} \\
 & - 101,69 \text{ Concentración NC}_{6,00\%} - 53,42 \text{ Tiempo (h)}_1 \\
 & - 19,62 \text{ Tiempo (h)}_3 \\
 & - 0,18 \text{ Tiempo (h)}_4 - 0,82 \text{ Tiempo (h)}_5 + 14,52 \text{ Tiempo (h)}_{24} \\
 & + 59,53 \text{ Tiempo (h)}_{72} - 16,66 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{0,00\% 1} \\
 & - 10,16 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{0,00\% 3} \\
 & + 0,25 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{0,00\% 4} \\
 & + 3,97 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{0,00\% 5} \\
 & - 11,37 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{0,00\% 24} \\
 & + 33,98 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{0,00\% 72} \\
 & - 53,35 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{2,00\% 1} \\
 & - 20,63 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{2,00\% 3} \\
 & + 20,26 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{2,00\% 4} \\
 & + 8,56 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{2,00\% 5} \\
 & - 6,78 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{2,00\% 24} \\
 & + 51,94 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{2,00\% 72} \\
 & + 21,58 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{3,00\% 1} \\
 & + 0,62 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{3,00\% 3} \\
 & - 15,54 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{3,00\% 4} \\
 & - 6,64 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{3,00\% 5} \\
 & + 13,61 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{3,00\% 24} \\
 & - 13,63 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{3,00\% 72} \\
 & + 20,86 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{4,00\% 1} \\
 & + 12,71 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{4,00\% 3} \\
 & + 5,13 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{4,00\% 4} \\
 & - 1,85 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{4,00\% 5} \\
 & + 2,43 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{4,00\% 24} \\
 & - 39,27 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{4,00\% 72} \\
 & + 27,57 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{6,00\% 1} \\
 & + 17,47 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{6,00\% 3} \\
 & - 10,09 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{6,00\% 4} \\
 & - 4,03 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{6,00\% 5} \\
 & + 2,11 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{6,00\% 24} \\
 & - 33,02 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{6,00\% 72}
 \end{aligned}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	% Hinchamiento	Ajuste	Resid	Resid est.
4	267,3	314,1	-46,8	-2,85 R
16	395,6	437,4	-41,9	-2,54 R
55	48,9	97,5	-48,7	-2,96 R

Residuo grande R

HOJA DE TRABAJO 1

Comparaciones para % Hinchamiento

Comparaciones por parejas de Tukey: Concentración NC

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

Concentración	N	Media	Agrupación
NC			
0,00%	18	343,934	A

2,00%	18 341,989	A	
3,00%	18 163,324		B
4,00%	18 130,108		C
6,00%	18 117,729		C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: Tiempo (h)

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

Tiempo (h)	N	Media	Agrupación
72	15	278,942	A
24	15	233,937	B
4	15	219,235	B C
5	15	218,601	B C
3	15	199,793	C
1	15	165,992	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: Concentración NC*Tiempo (h)

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

Concentración	NC*Tiempo (h)	N	Media	Agrupación
2,00%	72	3	453,450	A
0,00%	72	3	437,440	A
2,00%	4	3	362,069	B
2,00%	5	3	349,729	B
2,00%	24	3	349,729	B
0,00%	5	3	347,086	B
0,00%	24	3	347,086	B
0,00%	4	3	343,997	B
0,00%	3	3	314,147	B C
2,00%	3	3	301,738	B C
0,00%	1	3	273,849	C D
2,00%	1	3	235,219	D E
3,00%	72	3	209,222	D E F
3,00%	24	3	191,450	E F G
3,00%	5	3	155,872	F G H
4,00%	72	3	150,363	F G H
3,00%	4	3	147,600	F G H
4,00%	24	3	147,058	F G H
3,00%	3	3	144,319	G H
6,00%	72	3	144,234	G H
4,00%	4	3	135,051	G H
6,00%	24	3	134,364	G H
3,00%	1	3	131,482	G H
4,00%	5	3	127,440	G H
4,00%	3	3	123,190	H
6,00%	3	3	115,574	H
6,00%	5	3	112,880	H
6,00%	4	3	107,455	H

4,00% 1	3	97,542	H
6,00% 1	3	91,870	H

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo D: ANOVA y Tukey para pruebas de liberación

Modelo lineal general: %Liberación vs. Concentración NC; Tiempo (h)

Método

Codificación de factores (-1; 0; +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Concentración NC	Fijo	4	0,00%; 2,00%; 3,00%; 4,00%
Tiempo (h)	Fijo	8	1; 2; 3; 5; 6; 24; 48; 72

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Concentración NC	3	7,959	2,653	1,20	0,317
Tiempo (h)	7	264,508	37,787	17,09	0,000
Concentración NC*Tiempo (h)	21	367,779	17,513	7,92	0,000
Error	64	141,526	2,211		
Total	95	781,772			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,48706	81,90%	73,13%	59,27%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	11,110	0,152	73,20	0,000	
Concentración NC					
0,00%	0,488	0,263	1,86	0,068	1,50
2,00%	-0,166	0,263	-0,63	0,530	1,50
3,00%	-0,078	0,263	-0,29	0,769	1,50
Tiempo (h)					
1	-4,172	0,402	-10,39	0,000	1,75
2	-0,348	0,402	-0,87	0,390	1,75
3	0,534	0,402	1,33	0,189	1,75
5	0,684	0,402	1,70	0,093	1,75
6	0,793	0,402	1,97	0,053	1,75
24	1,410	0,402	3,51	0,001	1,75
48	0,030	0,402	0,07	0,941	1,75
Concentración NC*Tiempo (h)					
0,00% 1	2,998	0,696	4,31	0,000	2,63
0,00% 2	-0,999	0,696	-1,44	0,156	2,62
0,00% 3	-0,614	0,696	-0,88	0,380	2,63
0,00% 5	-2,011	0,696	-2,89	0,005	2,63
0,00% 6	-2,922	0,696	-4,20	0,000	2,62
0,00% 24	4,096	0,696	5,89	0,000	2,63
0,00% 48	-0,923	0,696	-1,33	0,189	2,63
2,00% 1	0,664	0,696	0,95	0,344	2,62
2,00% 2	1,855	0,696	2,67	0,010	2,62
2,00% 3	0,220	0,696	0,32	0,752	2,63
2,00% 5	0,341	0,696	0,49	0,626	2,62
2,00% 6	0,386	0,696	0,56	0,581	2,62
2,00% 24	-1,854	0,696	-2,67	0,010	2,63
2,00% 48	-0,986	0,696	-1,42	0,161	2,63

3,00% 1	-0,290	0,696	-0,42	0,678	2,63
3,00% 2	0,992	0,696	1,43	0,159	2,62
3,00% 3	0,767	0,696	1,10	0,274	2,63
3,00% 5	1,825	0,696	2,62	0,011	2,63
3,00% 6	1,825	0,696	2,62	0,011	2,62
3,00% 24	-1,510	0,696	-2,17	0,034	2,63
3,00% 48	0,978	0,696	1,41	0,164	2,63

Ecuación de regresión

$$\begin{aligned}
 \%Liberacion = & 11,110 + 0,488 \text{ Concentración NC}_{0,00\%} \\
 & - 0,166 \text{ Concentración NC}_{2,00\%} \\
 & - 0,078 \text{ Concentración NC}_{3,00\%} - 0,245 \text{ Concentración NC}_{4,00\%} \\
 & - 4,172 \text{ Tiempo (h)}_1 - 0,348 \text{ Tiempo (h)}_2 + 0,534 \text{ Tiempo (h)}_3 \\
 & + 0,684 \text{ Tiempo (h)}_5 + 0,793 \text{ Tiempo (h)}_6 + 1,410 \text{ Tiempo (h)}_{24} \\
 & + 0,030 \text{ Tiempo (h)}_{48} + 1,070 \text{ Tiempo (h)}_{72} \\
 & + 2,998 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{0,00\%} 1 \\
 & - 0,999 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{0,00\%} 2 \\
 & - 0,614 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{0,00\%} 3 \\
 & - 2,011 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{0,00\%} 5 \\
 & - 2,922 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{0,00\%} 6 \\
 & + 4,096 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{0,00\%} 24 \\
 & - 0,923 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{0,00\%} 48 \\
 & + 0,375 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{0,00\%} 72 \\
 & + 0,664 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{2,00\%} 1 \\
 & + 1,855 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{2,00\%} 2 \\
 & + 0,220 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{2,00\%} 3 \\
 & + 0,341 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{2,00\%} 5 \\
 & + 0,386 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{2,00\%} 6 \\
 & - 1,854 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{2,00\%} 24 \\
 & - 0,986 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{2,00\%} 48 \\
 & - 0,626 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{2,00\%} 72 \\
 & - 0,290 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{3,00\%} 1 \\
 & + 0,992 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{3,00\%} 2 \\
 & + 0,767 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{3,00\%} 3 \\
 & + 1,825 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{3,00\%} 5 \\
 & + 1,825 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{3,00\%} 6 \\
 & - 1,510 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{3,00\%} 24 \\
 & + 0,978 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{3,00\%} 48 \\
 & - 4,588 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{3,00\%} 72 \\
 & - 3,372 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{4,00\%} 1 \\
 & - 1,848 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{4,00\%} 2 \\
 & - 0,373 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{4,00\%} 3 \\
 & - 0,155 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{4,00\%} 5 \\
 & + 0,711 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{4,00\%} 6 \\
 & - 0,732 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{4,00\%} 24 \\
 & + 0,930 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{4,00\%} 48 \\
 & + 4,839 \text{ Concentración NC*Tiempo (h)}_{4,00\%} 72
 \end{aligned}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	%Liberacion	Ajuste	Resid	Resid est.
16	14,051	17,105	-3,053	-2,51 R
18	20,448	17,105	3,344	2,75 R
46	13,945	11,388	2,556	2,11 R
48	8,303	11,388	-3,085	-2,54 R
59	16,940	13,542	3,398	2,80 R

Residuo grande R

HOJA DE TRABAJO 2

Comparaciones para %Liberacion

Comparaciones por parejas de Tukey: Tiempo (h)

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

Tiempo (h)	N	Media	Agrupación
24	12	12,5206	A
72	12	12,1800	A
6	12	11,9031	A
5	12	11,7943	A
3	12	11,6442	A
48	12	11,1405	A
2	12	10,7630	A
1	12	6,9382	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.