

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

**Elaboración de Hidrogeles Fluorescentes Basados en Quitosano-
Almidón Oxidado**

Giani Paúl Rodríguez Moreno

Ingeniería Química

Trabajo de integración curricular presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero Químico

Quito, 17 de diciembre de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO CIENCIAS E INGENIERÍAS

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Elaboración de Hidrogeles Fluorescentes Basados en Quitosano-Almidón
Oxidado

Giani Paúl Rodríguez Moreno

Calificación:

José Mora, Ph.D.

Firma del profesor:

José Alvarez-Barreto, Ph.D.

Firma del profesor:

Quito, 17 de diciembre de 2019

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 el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Giani Paúl Rodríguez Moreno

Código: 00125049

Cédula de identidad: 1720749322

Lugar y fecha: Quito, 17 de diciembre de 2019

RESUMEN

El propósito de este estudio es investigar un método para unir el anhídrido 1,8-naftalico a la estructura química del quitosano para obtener hidrogeles fluorescentes sensibles al pH junto con almidón oxidado como agente entrecruzante. El protocolo de modificación consistió en un mecanismo de reacción de reflujo. Este último es el que obtuvo la mayor intensidad de fluorescencia lograda. Las muestras obtenidas en cada protocolo se sometieron a caracterizaciones en términos de FTIR, intensidad de fluorescencia, análisis estadístico de varianza y pruebas de comparación de Tukey. Como no se obtuvo respuesta lineal en los experimentos de pH, se demostró que este hidrogel es un material que podría usarse como sensor de pH dentro de rangos o muy ácidos o muy básicos. La proporción de quitosano modificado: almidón oxidado que fue adecuado fue 2: 1. Esta investigación puede proporcionar una forma conveniente de preparar biomateriales no tóxicos y de bajo costo para monitorear pH en sistemas biológicos. Sería necesario realizar ensayos futuros *in vivo* e *in vitro*.

Palabras Clave: Quitosano, Almidón Oxidado, Fluorescencia, Sensor, pH, Temperatura

ABSTRACT

The purpose of this study is to investigate a method for linking 1,8-naphthalic anhydride to the chitosan backbone in order to obtain pH responsive fluorescent hydrogels along with oxidized starch as a cross-linking compound. The protocol consisted of a reflux reaction mechanism. The latter being the one with the highest fluorescence intensity achieved. The samples obtained in each protocol were subjected to characterizations in terms of FTIR spectra, fluorescence intensity, statistical analysis of variance and Tukey comparison tests. Since no linear response was obtained in the pH experiments, this hydrogel was proven to be a material that could be used as a pH sensor in either very acidic or very basic environments. The proportion of modified-chitosan : oxidized starch that was adequate was 2:1. This investigation may provide a convenient way to prepare low-cost and non-toxic biomaterial to probe pH in biological systems. Future in vivo and in vitro assays would need to be conducted.

Keywords: Chitosan, oxidized starch, fluorescence, probe, pH, temperature.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| 1. Introducción | 8 |
| 1.1. Objetivo Principal | 11 |
| 1.2. Objetivos Específicos | 11 |
| 2. Metodología | 11 |
| 2.1. Funcionalización del Quitosano | 11 |
| 2.2. Oxidación del Almidón | 11 |
| 2.3. Reacción de Entrecruzamiento | 12 |
| 2.4. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) | 12 |
| 2.5. Mediciones de intensidad de fluorescencia | 12 |
| 2.6. Ensayos de pH | 13 |
| 2.7. Análisis estadístico | 13 |
| 3. Resultados y Discusión | 13 |
| 3.1. Análisis de espectros FTIR | 13 |
| 3.2. Intensidad de Fluorescencia | 15 |
| 3.3. Formulación de hidrogel | 16 |
| 3.3.1 Efecto de la proporción | 16 |
| 3.4. Dependencia del pH | 18 |
| 4. Conclusiones | 20 |
| 5. Referencias | 21 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Concentraciones experimentales utilizadas en la reacción | 12 |
| Tabla 2: Resultados de intensidad de fluorescencia para los hidrogeles | 18 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Porción del espectro FTIR de la muestra obtenida por el protocolo de reacción de reflujo..... | 14 |
| Figura 2: Intensidad de Fluorescencia para el protocolo obtenido. El blanco consistió en una solución de ácido acético 0.1M, ya que se utilizó como disolvente para todas las mediciones de fluorescencia. | 15 |
| Figura 3: Hidrogeles CHI-NAN / OS visualizados bajo una cámara UV (excitación a 365 nm). El pH y la temperatura se establecieron constantes durante este experimento (pH = 5.5, Tamb) | 17 |
| Figura 4: Intensidad de fluorescencia de hidrogeles de quitosano modificado 1: 1 a diferentes valores de pH | 19 |

1. Introducción

Durante la última década, la investigación sobre polímeros fluorescentes se ha convertido en un área interesante debido a sus aplicaciones versátiles como sondas luminiscentes en diversos campos (Zhang y Yang, 2013). Hay dos formas reportadas de preparar polímeros fluorescentes. La primera implica la polimerización de monómeros que contienen cromóforos fluorescentes. Yang et al., 2009 reportaron un estudio en el que sintetizaron un cromóforo conocido como citrato de polioctametileno y se incorporaron a un esqueleto de L-cisteína para producir un aminoácido fluorescente. La otra forma de sintetizar tales compuestos es modificando un polímero con una molécula fluorescente. Por ejemplo, Wang K., et. al. reportaron una forma de modificar el poli(anhídrido de estireno-co-maleico) con una molécula fluorescente derivada de las naftalimidias. (2002) Dado que los polímeros en este estudio provienen de fuentes naturales, son candidatos adecuados para aplicaciones biomédicas en forma de hidrogeles debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad. (Bhattarai, Gunn y Zhang, 2010)

En la última década, se han realizado muchos estudios sobre hidrogeles fluorescentes basados en polímeros de fuentes naturales (Geng et al., 2015). Un estudio informado por Heo, Y. J., et al. muestra la fabricación de fibras de hidrogel para la detección de glucosa. Probaron sus muestras en ratones y mostraron que las fibras fluorescentes respondían continuamente a los cambios en la concentración de glucosa en la sangre durante un máximo de 140 días, lo que los hacía candidatos perfectos para el monitoreo de glucosa *in vivo* a largo plazo.

Las sondas fluorescentes *in vivo* se han convertido en herramientas cruciales en la ingeniería biomédica y la investigación en medicina de diagnóstico. Están diseñados para el seguimiento continuo y a largo plazo de analitos objetivo en sistemas biológicos. (Sharma, SK, 2003) Ha habido muchos estudios que muestran la detección de analitos fisiológicamente

relevantes, con un gran potencial para el monitoreo in vivo. (Zhang y Yang, 2013) Sin embargo, hasta donde sabemos, ninguno de ellos ha intentado utilizando polímeros naturales modificados como el quitosano con anhídrido 1,8-naftalico para realizar la detección del pH.

Un ejemplo del uso de hidrogeles a base de quitosano es el estudio realizado por Geng et al., 2015. Prepararon una solución de quitosano gelatinizada con fluoróforos a base de glutaraldehído como agente de reticulación para crear un hidrogel 3D. Este hidrogel se utilizó para detectar bajas concentraciones de Hg^{2+} en el agua. Determinaron que el hidrogel en medios acuosos exhibe una respuesta lineal en el rango de 5-50 nM de Hg^{2+} . De la misma manera que estos autores usan hidrogeles para la detección de metales pesados, los hidrogeles fluorescentes podrían usarse ampliamente en el futuro dentro del campo biomédico. La característica de origen natural del quitosano y el almidón, y la baja toxicidad y el costo del fluoróforo anhídrido 1,8-naftalico son factores importantes que harán de este hidrogel un candidato perfecto para monitorear los cambios de pH dentro de la anatomía humana.

El quitosano, el producto desacetilado de la citina, ha sido de gran interés entre las investigaciones debido a sus propiedades biológicas dinámicas: baja toxicidad y buena biocompatibilidad. (Zheng, LY, 2003) La síntesis de sus derivados ha tenido diferentes aplicaciones en estudios recientes, como la industria alimentaria donde se utilizó como inhibidor de agentes microbianos (Tayel, A., et al, 2010), en medicina como un apósito para heridas muy efectivo (Jayakumar, R., 2011), y en forma de nanopartículas en sistemas de administración de fármacos. (Agnihotri, S. A., 2004). La ventaja de usar quitosano es que debería permitir la compatibilidad del complejo fluoróforo-quitosano dentro de los sistemas biológicos.

Por otro lado, el anhídrido 1,8-naftálico se usa ampliamente como intermedio para la preparación de imidas y derivados de imida. Algunos ejemplos de sus aplicaciones incluyen: colorantes a base de imidazol y abrillantadores ópticos, antidotos herbicidas y un par de aplicaciones biológicas. (Konstantinova, T. N., 1993) También se han realizado evaluaciones toxicológicas del anhídrido 1,8-naftalico obteniendo valores bajos de toxicidad en animales. (Chemie, B. G., 2011). La aplicación de anhídrido 1,8-naftálico como fluoróforo generalmente involucra la versión de la molécula sustituida con halógeno (Chen, H., 2016). Se ha informado de muchos estudios que muestran cómo los derivados de imida del anhídrido 1,8-naftálico han funcionado como agentes fluorescentes efectivos para materiales poliméricos. (Grabtchev, I., 1995) Sin embargo, ninguno de ellos ha utilizado el único anhídrido 1,8-naftálico para realizar una reacción con un polímero natural.

El almidón es un polímero biodegradable compuesto por muchas unidades de glucosa. En términos de estructura molecular, contiene amilosa lineal y amilopectina ramificada. (Hu, G., 2009). En este estudio, se utilizará una modificación química (oxidación) del almidón como agente de reticulación para formar hidrogeles con quitosano modificado. El almidón oxidado (OS) contiene más grupos carbonilo disponibles para reaccionar con los grupos amina presentes en el quitosano formando una base de Schiff. El almidón oxidado se ha estudiado antes y mostró un mejor rendimiento como hidrogel. (Ismail, H., 2013). Este proceso permitirá que los hidrogeles tengan mejores propiedades mecánicas, lo que lo hace apropiado para la aplicación como sonda fluorescente.

1.1. Objetivo Principal

Elaborar hidrogeles fluorescentes basados en quitosano modificado con anhídrido 1,8-naftálico y almidón oxidado para un uso potencial como sonda para el monitoreo de pH

1.2. Objetivos Específicos

- a) Funcionalizar el quitosano con el 1,8-anhídrido naftálico.
- b) Preparar hidrogeles con quitosano funcionalizado entrecruzado con almidón oxidado
- c) Analizar la sensibilidad y la intensidad de fluorescencia del hidrogel en función de las variaciones de pH.

2. Metodología

2.1. Funcionalización del Quitosano

Esta metodología se basó en el informado por Munro, Hanton, Robinson y Simpson, 2008 con algunas modificaciones experimentales. Brevemente, se añadieron 0,4 g de Quitosano (CHI) a una solución de 0,4 g de anhídrido 1,8-naftálico (NAN) en 50 ml de dimetilformamida (DMF). La mezcla se calentó a reflujo durante 3 ha 100 ° C. Luego se filtró la solución para eliminar el sobrenadante, y se realizó un lavado completo del sólido con DMF caliente seguido de etanol absoluto. La muestra se secó luego a 40 ° C.

2.2. Oxidación del Almidón

La oxidación del almidón se realizó con base en la metodología propuesta por Ziegler-Borowska, Wegrzynowska-Drzymalska, Chelminiak-Dudkiewicz, Kowalonek y Kaczmarek, 2018. Se preparó una suspensión de almidón de yuca en agua destilada (5% m/v) a temperatura ambiente. El proceso de oxidación se realizó con una solución de peryodato de sodio en agua destilada (5% m/v). Ambas soluciones se mezclaron en una proporción de almidón: peryodato de

2: 1 bajo agitación moderada a temperatura ambiente y un ambiente oscuro durante 5 h (el pH permaneció constante durante la reacción). La mezcla se filtró al vacío y se secó a 40°C.

2.3. Reacción de Entrecruzamiento

La reacción de entrecruzamiento se realizó usando una suspensión de almidón oxidado junto con la solución de quitosano funcionalizado (pH = 4,5-5,5). La solución de almidón oxidado se gelatinizó a 80 °C bajo agitación moderada. Se utilizaron diferentes proporciones de quitosano funcionalizado versus almidón oxidado (1: 1, 2: 1, 3: 1). Los diferentes valores de concentración utilizados para las soluciones iniciales se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1: Concentraciones experimentales utilizadas en la reacción

| Quitosano Funcionalizado [%m/v] | Almidón Oxidado [%w/v] |
|---|--------------------------------------|
| 2 | 5 |
| 5 | 10 |
| - | 15 |
| - | 20 |

2.4. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros infrarrojos se obtuvieron usando un espectrómetro Cary 630 FTIR con ATR de Agilent Technologies en un rango de frecuencias de 0 a 4500 [cm⁻¹].

2.5. Mediciones de intensidad de fluorescencia

Todas las muestras de fluorescencia se analizaron utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia JENWAY 6270 a una longitud de onda de excitación de 350 nm y una emisión de 460 nm. Las muestras obtenidas se prepararon en una concentración de 0.1% m/v usando ácido acético 0.1M como solvente. Los resultados se presentan en unidades de fluorescencia relativa (RFU)

2.6. Ensayos de pH

El pH de la solución de PBS se reguló a diferentes valores (3, 4, 5.5, 6.5 y 7.2) usando soluciones de NaOH y HCl. Los hidrogeles se incubaron en estas soluciones durante 3 horas a 32°C. Después se midió la intensidad de fluorescencia.

2.7. Análisis estadístico

Se aplicó una prueba de comparación ANOVA y Tukey de una vía a los experimentos de pH. Con respecto al análisis ANOVA, se eligió un valor alfa de $\alpha = 0.05$ y la hipótesis nula indicó que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las medias para las variables estudiadas.

3. Resultados y Discusión

3.1. Análisis de espectros FTIR

La Figura 1 muestra una porción del espectro FTIR de la muestra obtenida por el método de reacción de reflujo. El espectro completo se puede encontrar en el Anexo A. El espectro FTIR de esta muestra mostró un cambio significativo en 1705 cm^{-1} en adelante. Estos datos confirmaron la modificación del polímero una vez comparado con el que fue fabricado por Munro et al., 2008, donde se usó anhídrido 4-bromonaftálico como fluoróforo en la reacción. Dado que la estructura de este compuesto es muy similar a la utilizada en el presente estudio, fue una elección precisa para comparar los resultados aquí informados. En este sentido, el espectro descrito en el estudio

mencionado mostró una parte del espectro FTIR. Los investigadores descubrieron que el polímero modificado tenía un estiramiento C = O a 1705 cm^{-1} . Esta banda corresponde a los grupos imida que se formaron durante la reacción de funcionalización. (Clark, R. N., et.al., 2009) El objetivo en este proyecto era obtener el mismo pico a 1705 cm^{-1} .

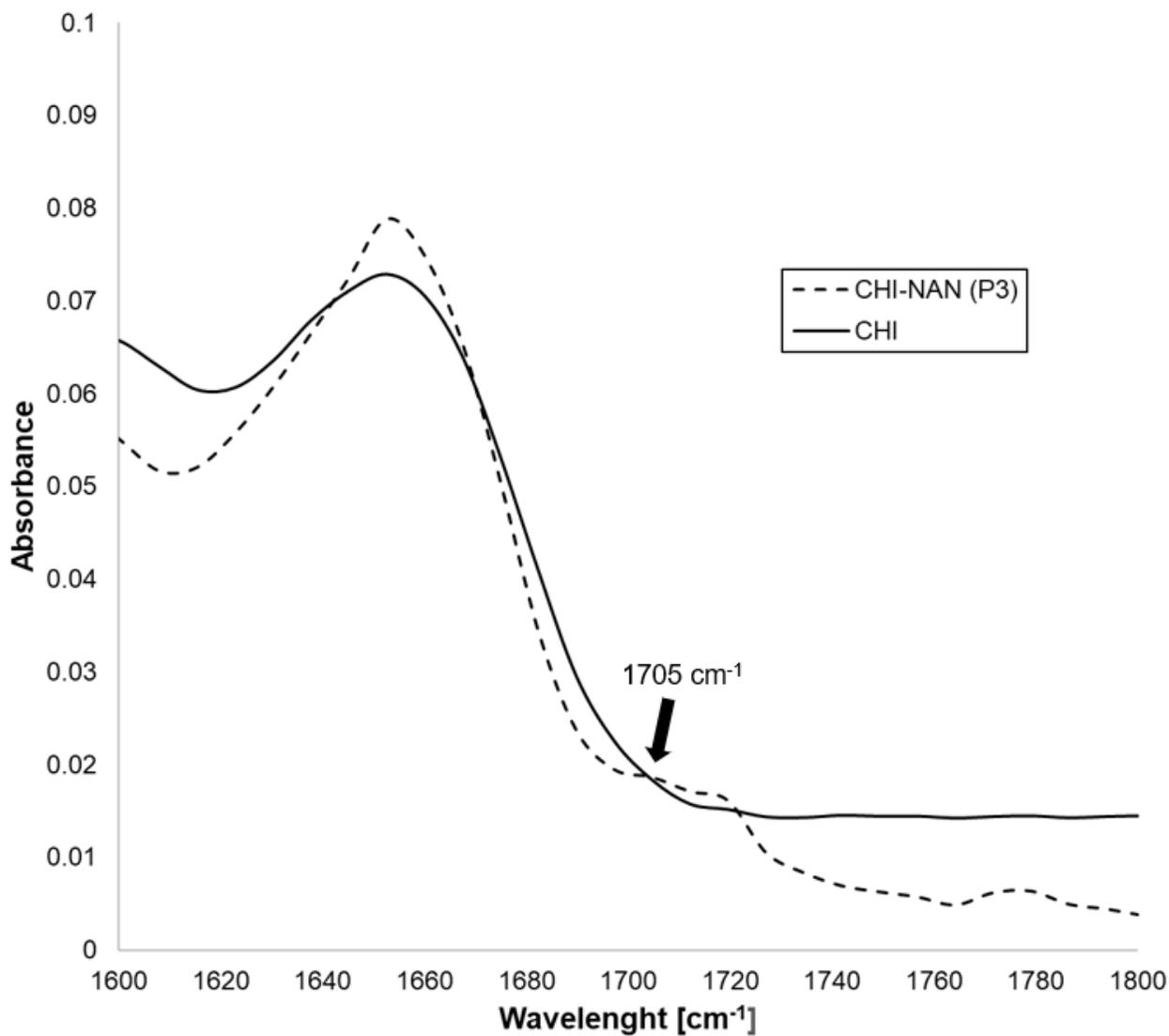


Figura 1: Porción del espectro FTIR de la muestra obtenida por el protocolo de reacción de reflujo.

3.2. Intensidad de Fluorescencia

El protocolo usado para funcionalizar fue el que implicaba la reacción de reflujo. La Figura 2 muestra los resultados obtenidos para la intensidad de fluorescencia. El estudio realizado por Munro et al., 2008, estimó que el grado de sustitución del anhídrido 4-bromonaftálico en la molécula de quitosano con diferentes solventes fue aproximadamente del 12% con condiciones de modificación similares a las utilizadas. En este estudio, la Figura 1 muestra que el protocolo de reacción de reflujo tuvo el mayor valor de intensidad de fluorescencia en concordancia con lo obtenido en la literatura, lo que significa que esta reacción es factible y se demostró que es adecuada para funcionalizar CHI con NAN.

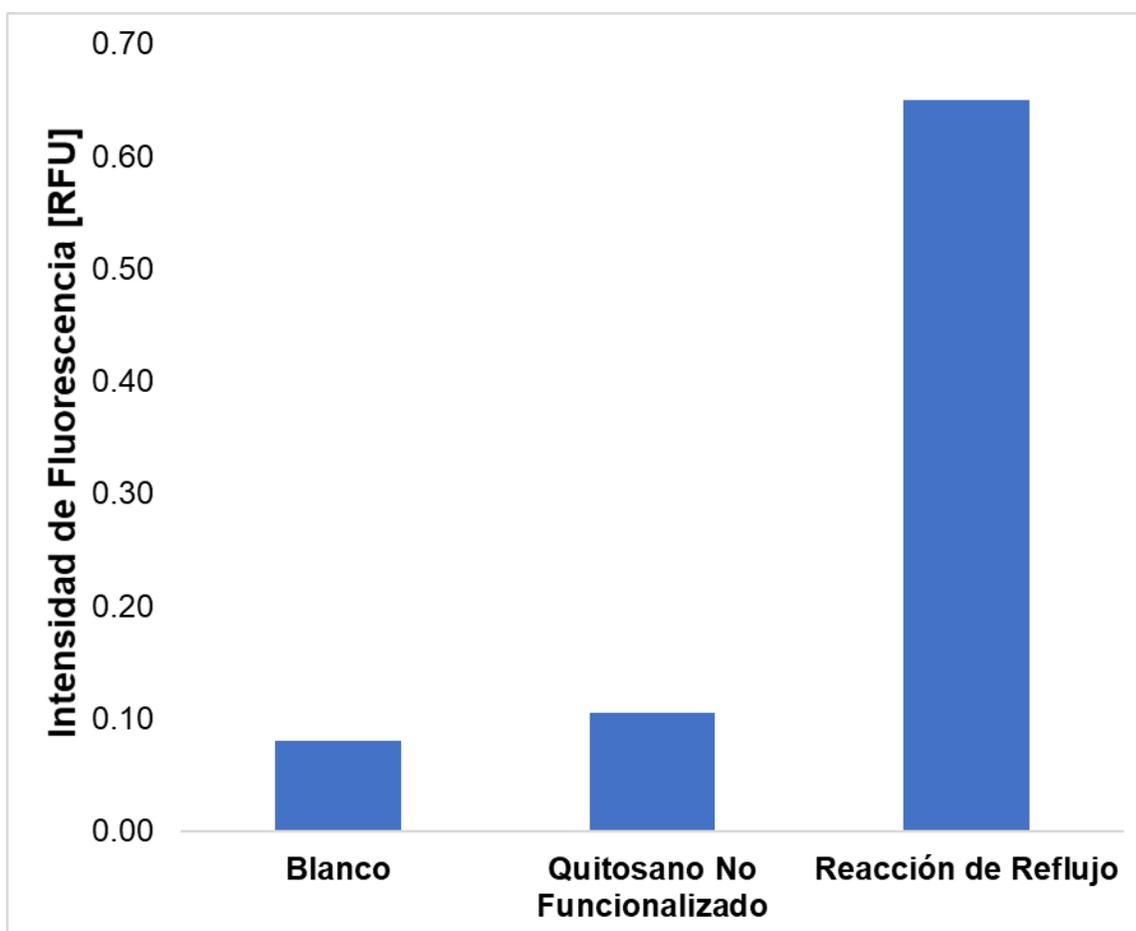


Figura 2: Intensidad de Fluorescencia para el protocolo obtenido. El blanco consistió en una solución de ácido acético 0.1M, ya que se utilizó como disolvente para todas las mediciones de fluorescencia.

3.3. Formulación de hidrogel

La razón principal para usar OS como agente entrecruzante para los hidrogeles es porque OS tiene una gran cantidad de grupos aldehído en su estructura. Estudios anteriores muestran el uso de glutaraldehído o formaldehído como complejos de entrecruzamiento. Sin embargo, se demostró que estos compuestos son químicamente tóxicos. (Thrasher, J. D., 2001). Por lo tanto, OS sirve como un agente de entrecruzamiento natural mediante una conjugación entre los grupos amino primarios en CHI y los grupos aldehídos libres en OS que forman una base de Schiff. (Baran, E. T., 2004)

3.3.1 Efecto de la proporción

Las proporciones establecidas en la Tabla 1 se probaron para ver qué formulación de hidrogel se usaría para los ensayos de pH. Cuando se usaba una concentración menor tanto para la solución de OS gelatinizada como para la solución de quitosano modificado, el hidrogel no era muy estable ya que mostraba una textura muy líquida. Una vez que se aumentó la concentración de solución de OS, se alcanzó una configuración sólida del hidrogel. Después de varias pruebas, se eligió la proporción adecuada de las soluciones para ser una solución de almidón oxidado al 10% m/v y una solución de quitosano modificado al 2% m/v.

La Figura 3 muestra diferentes proporciones de masa de los hidrogeles fluorescentes. La proporción se refiere a CHI modificado: OS. Además, también se preparó una muestra de control para obtener confirmación visual de fluorescencia. La muestra de control se preparó en las mismas concentraciones establecidas anteriormente, pero usando CHI no funcionalizado. Está claro que, en comparación con la muestra de control, el fenómeno de fluorescencia es evidente en las

muestras de interés. Sin embargo, no hay diferencia visual entre las diferentes proporciones másicas de los hidrogeles fluorescentes presentados.

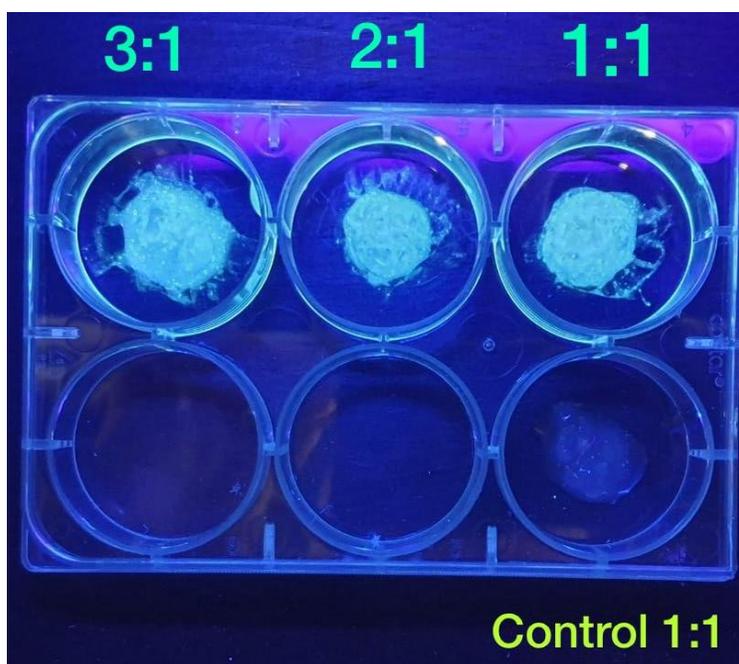


Figura 3: Hidrogeles CHI-NAN / OS visualizados bajo una cámara UV (excitación a 365 nm). El pH y la temperatura se establecieron constantes durante este experimento (pH = 5.5, Tamb)

Para confirmar las diferencias en la intensidad de fluorescencia, las muestras se analizaron en un fluorímetro. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Los hidrogeles modificados son de hecho más fluorescentes que los no modificados y reportan casi 4 veces más señal de intensidad que los que contienen quitosano nativo en su configuración. Asimismo, se observa una tendencia creciente en la intensidad de fluorescencia a medida que la proporción de quitosano aumenta.

Se puede observar cierta fluorescencia en los blancos. El CHI no modificado no exhibió una intensidad de fluorescencia significativa como se muestra en la Figura 2. La amilosa y la amilopectina presentes en el almidón no son fluorescentes. Sin embargo, se ha demostrado que los gránulos de almidón tienen una membrana de proteína muy delgada que rodea su superficie, lo

que podría ser la razón de los valores de intensidad de fluorescencia observados en la Tabla 2. (Kokawa, M., et al, 2015)

Para los experimentos de pH, las composiciones utilizadas serán 1: 1 y 2: 1 ya que se observó una configuración sólida para los hidrogeles.

Tabla 2: Resultados de intensidad de fluorescencia para los hidrogeles

| Intensidad de Fluorescencia [RFU] | CHI : OS | | |
|---|-----------------|------------|------------|
| | 1:1 | 2:1 | 3:1 |
| Hidrogeles con Qitosano Modificado | 1.15 | 1.57 | 1.60 |
| Blanco (Hidrogeles con Qitosano no Modificado) | 0.26 | 0.35 | 0.32 |

3.4.Dependencia del pH

En cuanto a los ensayos de pH, se llevaron a cabo dos experimentos. El primero consistió en medir el pH de hidrogeles 1: 1. Los resultados se muestran en la Figura 4:

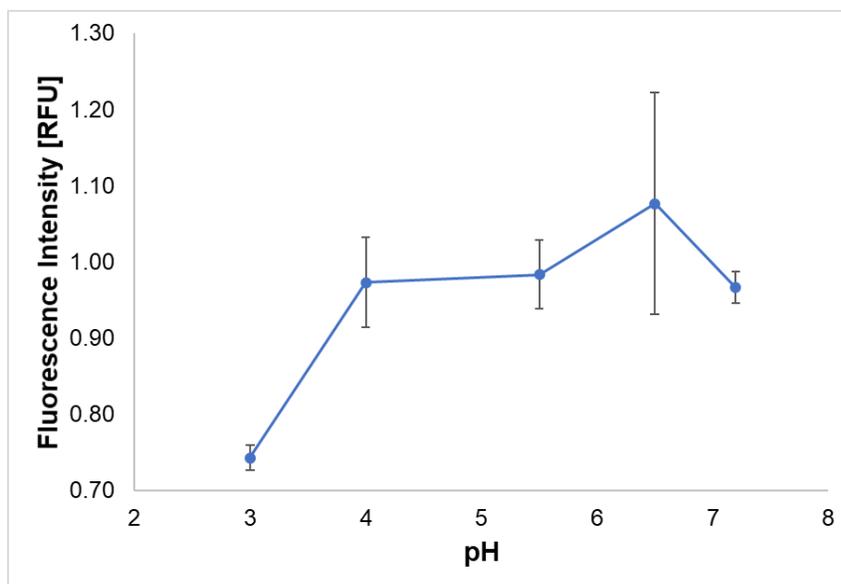


Figura 4: Intensidad de fluorescencia de hidrogeles de quitosano modificado 1: 1 a diferentes valores de pH

Como no se obtuvo una relación lineal, se decidió que los hidrogeles se sometieran a liofilización para aumentar la porosidad de modo que las soluciones a diferente pH pudieran penetrar profundamente en la estructura y mejorar el efecto del pH en la intensidad de fluorescencia.

Los resultados se muestran en la Figura 4. Es evidente que no se observa una respuesta lineal incluso cuando se utilizaron aerogeles. Un estudio previo realizado por Guan, X., Liu, X., y Su, Z. 2007 con respecto a la dependencia del pH de un complejo de fluoresceína-quitosano mostró que solo existía una tendencia lineal cuando el compuesto se sometía a ácidos o ácidos muy básicos. rangos de pH. Para una futura experimentación sobre este asunto, se necesitaría un intervalo más pequeño en el rango utilizado en este estudio para confirmar una respuesta lineal.

En términos del análisis estadístico, el ANOVA mostró que no había diferencia estadística entre los valores de pH y los datos de intensidad de fluorescencia. La prueba de Tukey mostró que las señales obtenidas para pH = 4, 5.5 y 7.2 eran estadísticamente iguales, lo que significa que no

había diferencia entre ellas. Sin embargo, los valores de pH 3 y 6.5 fueron estadísticamente diferentes. Los resultados de ANOVA y Tukey se presentan en el Anexo B.

4. Conclusiones

Se preparó un hidrogel fluorescente sensible al pH modificando quitosano con anhídrido 1,8-naftálico usando almidón oxidado como agente de entrecruzamiento. Los resultados presentados en este estudio demuestran que el quitosano funcionalizado, obtenido por una reacción de reflujo en DMF, podría usarse para crear una sonda de pH en rangos o muy ácidos o muy básicos. Se demostró que la proporción adecuada de CHI: OS modificado era 2: 1 debido al hecho de que se obtuvo un hidrogel fuerte y estable. Como no se obtuvo una dependencia lineal del pH en el rango propuesto, este producto no se debe utilizar como sensor de pH en un amplio rango. Sin embargo, el hidrogel CHI-NAN se puede aplicar en el campo biomédico, ya que proviene de fuentes naturales, y está compuesto de materiales económicos y no tóxicos. Además, se espera que este material se use como una sonda de pH para determinar los cambios en los sistemas biológicos, y se recomienda realizar más pruebas *in vitro* e *in vivo*.

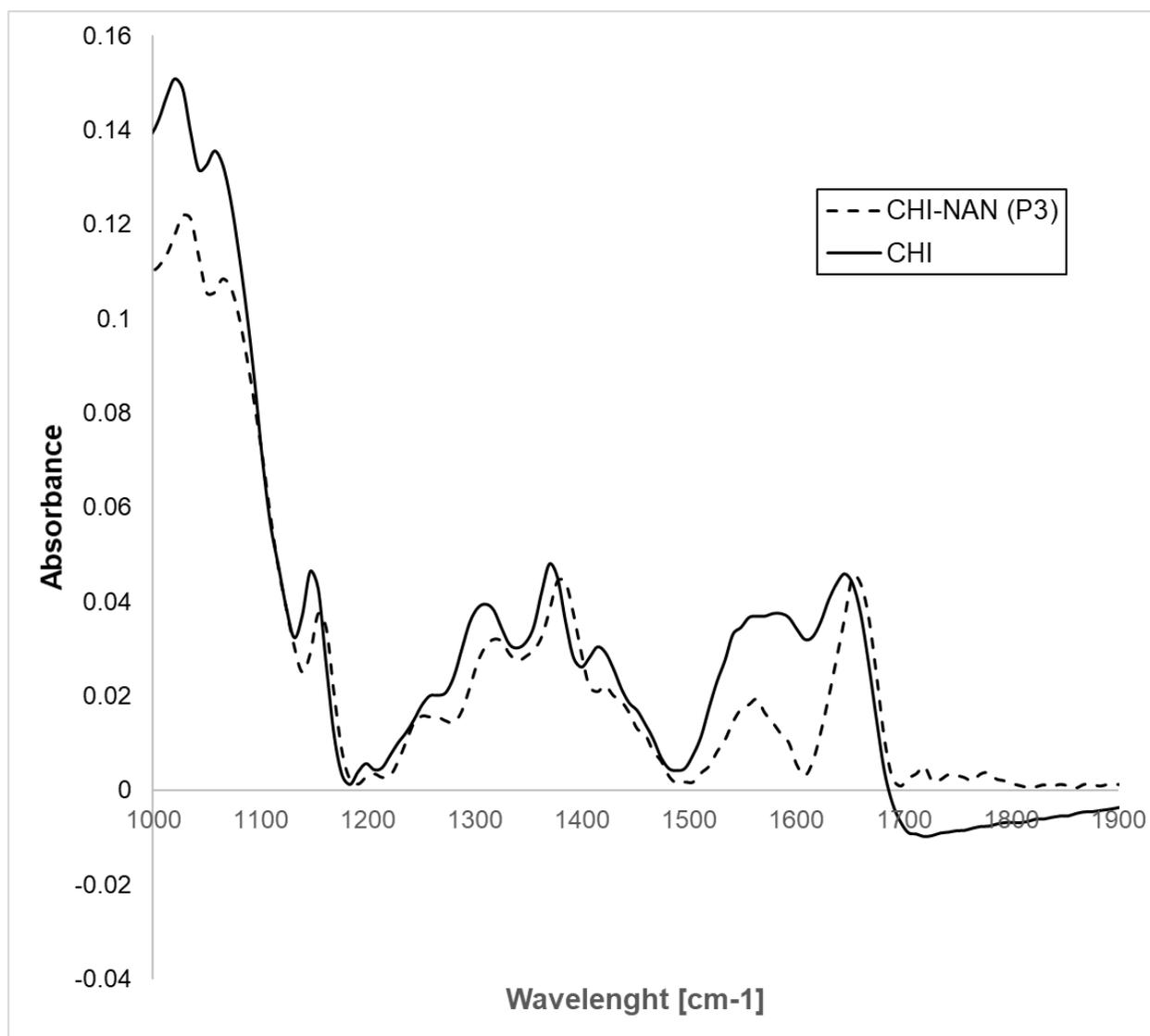
5. Referencias

- Albani, J. R. (2007). *Principles and applications of fluorescence spectroscopy*. Blackwell Science.
- Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., & Aminabhavi, T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, *100*(1), 5–28. <http://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2004.08.010>
- Baran, E. T., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2004). Starch-chitosan hydrogels prepared by reductive alkylation cross-linking. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *15*(7), 759–765. <https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000032815.86972.5e>
- Benitez, N., (2013) *Obtención de hidrogeles, mediante autoentrecruzamiento de quitosano y almidón de arroz oxidado*. Laboratorio de Ingeniería de Tejidos Humanos y Biomateriales. Fundación Instituto de Estudios Avanzados. Caracas, Venezuela.
- Bhattacharai, N., Gunn, J., & Zhang, M. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *62*(1), 83–99. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2009.07.019>
- Chemie, B. G. (2011). Toxicological Evaluations 6. *Toxicological Evaluations 6*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-84992-3>
- Chen, H., Xu, L., Ma, X., & Tian, H. (2016). Room temperature phosphorescence of 4-bromo-1,8-naphthalic anhydride derivative-based polyacrylamide copolymer with photo-stimulated responsiveness. *Polymer Chemistry*, *7*(24), 3989–3992. <https://doi.org/10.1039/C6PY00703A>
- Clark, R. N., Curchin, J. M., Hoefen, T. M., & Swayze, G. A. (2009). Reflectance spectroscopy of organic compounds. *Journal of Geophysical Research*, *114*(E3), E03001. <https://doi.org/10.1029/2008JE003150>
- Geng, Z., Zhang, H., Xiong, Q., Zhang, Y., Zhao, H., & Wang, G. (2015). A fluorescent chitosan hydrogel detection platform for the sensitive and selective determination of trace mercury(II) in water. *Journal of Materials Chemistry A*, *3*(38), 19455–19460. <https://doi.org/10.1039/c5ta05610a>
- Grabtchev, I., & Philipova, T. (1995). Synthesis of 1,8-naphthalic anhydride derivatives for use as fluorescent brightening agents for polymeric materials. *Dyes and Pigments*, *27*(4), 321–325. [https://doi.org/10.1016/0143-7208\(94\)00066-B](https://doi.org/10.1016/0143-7208(94)00066-B)
- Guan, X., Liu, X., & Su, Z. (2007). Preparation and photophysical behaviors of fluorescent chitosan bearing fluorescein: Potential biomaterial as temperature/pH probes. *Journal of Applied Polymer Science*, *104*(6), 3960–3966. <https://doi.org/10.1002/app.26200>
- Guo, X., Yan, H., Zhao, S., Li, Z., Li, Y., & Liang, X. (2013). Effect of calcining temperature on particle size of hydroxyapatite synthesized by solid-state reaction at room temperature. *Advanced Powder Technology*, *24*(6), 1034–1038. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2013.03.002>

- Heo, Y. J., Shibata, H., Okitsu, T., Kawanishi, T., & Takeuchi, S. (2011). Long-term in vivo glucose monitoring using fluorescent hydrogel fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(33), 13399–13403. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104954108>
- Hu, G., Chen, J., & Gao, J. (2009). Preparation and characteristics of oxidized potato starch films. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 291–298. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2008.10.032>
- Ismail, H., Irani, M., & Ahmad, Z. (2013). Starch-Based Hydrogels: Present Status and Applications. *International Journal of Polymeric Materials*, 62(7), 411–420. <https://doi.org/10.1080/00914037.2012.719141>
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Sudheesh Kumar, P. T., Nair, S. V., & Tamura, H. (2011). Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 29(3), 322–337. <http://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2011.01.005>
- Kokawa, M., Yokoya, N., Ashida, H., Sugiyama, J., Tsuta, M., Yoshimura, M., Shibata, M. (2015). Visualization of Gluten, Starch, and Butter in Pie Pastry by Fluorescence Fingerprint Imaging. *Food and Bioprocess Technology*, 8(2), 409–419. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1410-y>
- Konstantinova, T. N., Meallier, P., & Grabchev, I. (1993). The synthesis of some 1,8-naphthalic anhydride derivatives as dyes for polymeric materials. *Dyes and Pigments*, 22(3), 191–198. [https://doi.org/10.1016/0143-7208\(93\)87006-Z](https://doi.org/10.1016/0143-7208(93)87006-Z)
- Liu, X.-Q., Li, Z., Du, F.-S., & Li, F.-M. (1998). Vinyl monomers bearing chromophore moieties and their polymers. VII. Synthesis, photochemical, and initiation behavior of acrylic monomers bearing *Journal of Applied Polymer Science*, 70:1191-1199. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/228685123_Vinyl_monomers_bearing_chromophore_moieties_and_their_polymers_VII_Synthesis_photochemical_and_initiation_behavior_of_acrylic_monomers_bearing
- Munro, N. H., Hanton, L. R., Robinson, B. H., & Simpson, J. (2008). Synthesis and characterisation of fluorescent chitosan derivatives containing substituted naphthalimides. *Reactive and Functional Polymers*, 68(3), 671–678. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2007.11.003>
- Pereira, R., Carvalho, A., Vaz, D. C., Gil, M. H., Mendes, A., & Bártolo, P. (2013). Development of novel alginate-based hydrogel films for wound healing applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 52(1), 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.09.031>
- Reisch, A., & Klymchenko, A. S. (2016). Fluorescent Polymer Nanoparticles Based on Dyes: Seeking Brighter Tools for Bioimaging. *Small*, 12(15), 1968–1992. <https://doi.org/10.1002/sml.201503396>
- Rouhani, S., Gharanjig, K., & Nezhad, M. H. (2014). Facile synthesis of 4-nitro-N-substituted-1,8-naphthalimide derivatives using ultrasound in aqueous media. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 7(2), 174–178. <https://doi.org/10.1080/17518253.2014.901427>
- Sharma, S. K., Sehgal, N., & Kumar, A. (2003). Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Current Applied Physics*, 3(2–3), 307–316. [https://doi.org/10.1016/S1567-1739\(02\)00219-5](https://doi.org/10.1016/S1567-1739(02)00219-5)

- Tayel, A. A., Moussa, S., Opwis, K., Knittel, D., Schollmeyer, E., & Nickisch-Hartfiel, A. (2010). Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(1), 10–14. <http://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2010.04.005>
- Thrasher, J. D., & Kilburn, K. H. (2001). Embryo toxicity and teratogenicity of formaldehyde. *Archives of Environmental Health*, 56(4), 300–311. <https://doi.org/10.1080/00039890109604460>
- Turro, N. J., & Arora, K. S. (1986). Pyrene as a photophysical probe for intermolecular interactions of water-soluble polymers in dilute solutions. *Polymer*, 27(5), 783–796. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(86\)90140-0](https://doi.org/10.1016/0032-3861(86)90140-0)
- Viteri, D. (2018) *Development of a Film Based on Oxidized Ipomea Batatas L. Starch with Protein Encapsulation for Potential Skin Tissue Engineering Applications*. USFQ. Repositorio Digital.
- Wang, K., Huang, W., Xia, P., Gao, C., & Yan, D. (2002). Fluorescent polymer made from chemical modification of poly(styrene-co-maleic anhydride). *Reactive and Functional Polymers*, 52(3), 143–148. [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(02\)00088-3](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(02)00088-3)
- Yang, J., Zhang, Y., Gautam, S., Liu, L., Dey, J., Chen, W., ... Tang, L. (2009). Development of aliphatic biodegradable photoluminescent polymers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25), 10086–10091. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0900004106>
- Zhang, Y., & Yang, J. (2013). Design strategies for fluorescent biodegradable polymeric biomaterials. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(2), 132–148. <https://doi.org/10.1039/c2tb00071g>
- Ziegler-Borowska, M., Wegrzynowska-Drzymalska, K., Chelminiak-Dudkiewicz, D., Kowalonek, J., & Kaczmarek, H. (2018). Photochemical reactions in dialdehyde starch. *Molecules*, 87–100. <https://doi.org/10.3390/molecules23123358>
- Zheng, L. Y., & Zhu, J. F. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 527–530. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.07.009>

Anexo A: Espectro FTIR completo del Quitosano Funcionalizado



Anexo B: Resultados de ANOVA y Tukey para los experimentos de pH

One-way ANOVA: RFU versus pH

Method

Null hypothesis All means are equal
 Alternative hypothesis At least one mean is different
 Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

| Factor | Levels | Values |
|--------|--------|-------------------------|
| pH | 5 | 3.0, 4.0, 5.5, 6.5, 7.2 |

Analysis of Variance

| Source | DF | Adj SS | Adj MS | F-Value | P-Value |
|--------|----|---------|----------|---------|---------|
| pH | 4 | 0.16996 | 0.042490 | 5.09 | 0.017 |
| Error | 10 | 0.08353 | 0.008353 | | |
| Total | 14 | 0.25349 | | | |

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

| pH | N | Mean | Grouping |
|-----|---|--------|----------|
| 6.5 | 3 | 1.077 | A |
| 5.5 | 3 | 0.9833 | A B |
| 4.0 | 3 | 0.9733 | A B |
| 7.2 | 3 | 0.9667 | A B |
| 3.0 | 3 | 0.7533 | B |

Means that do not share a letter are significantly different.