

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

Estudio del entrecruzamiento entre quitosano funcionalizado y almidón oxidado por métodos hidrotérmicos

David Alejandro Pasquel Vera

Ingeniería Química

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

Quito, 21 de diciembre de 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

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

**Estudio del entrecruzamiento entre quitosano funcionalizado y almidón oxidado por
métodos hidrotérmicos**

David Alejandro Pasquel Vera

Nombre del profesor, Título académico **José Álvarez, PhD**

Nombre del profesor, Título académico **José Mora, PhD**

Quito, 21 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: David Alejandro Pasquel

Código: 00211382

Cédula de identidad: 1722737721

Lugar y fecha: Quito, 21 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UNPUBLISHED DOCUMENT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

El presente trabajo de investigación se enfoca en el entrecruzamiento entre quitosano funcionalizado con cianoguanidina y almidón oxidado por métodos hidrotérmicos. La funcionalización previa del quitosano con cianoguanidina permite tener un incremento en la estabilidad de hidrogeles que se forman a partir del entrecruzamiento de los polímeros. Se propone la preparación de almidón oxidado usando un reactor de síntesis de alta presión donde se obtuvo que la mejor configuración era a 200°C por 1.5 h, para el quitosano funcionalizado con cianoguanidina se utiliza igualmente un reactor de síntesis a alta presión donde los mejores resultados se obtuvieron cuando se mezcla 9.1 %p/p de cianoguanidina con el quitosano y finalmente en la formación de hidrogeles se realizó el entrecruzamiento en un baño maría a 60°C por 1 hora, de los cuales la mejor formulación de hidrogel tuvo 50% almidón oxidado y 50% quitosano funcionalizado en relación %p/p. Se llevaron a cabo análisis de grupos carbonilos con los cuales se seleccionó el mejor almidón oxidado, pruebas de hinchamiento para verificar la estabilidad de los hidrogeles, encapsulación y liberación de acetaminofén para comprobar su factibilidad en aplicaciones farmacéuticas, así como análisis FTIR para comprobar tanto la oxidación como funcionalización de los polímeros y SEM para analizar la morfología del hidrogel donde se observó la formación de estructuras en forma de panal de abejas. En conclusión, se consiguió realizar la oxidación del almidón, la funcionalización del quitosano con cianoguanidina y la formación de los hidrogeles, lo cuales vieron su estabilidad mejorada y presentaron la habilidad de realizar liberación de fármacos controlada.

Palabras clave: entrecruzamiento, quitosano funcionalizado, almidón oxidado, hidrogeles, análisis FTIR, análisis SEM, acetaminofén.

ABSTRACT

The present research focuses on the crosslinking between chitosan functionalized with cyanoguanidine and starch oxidized through hydrothermal methods. The prior functionalization of chitosan with cyanoguanidine allows for an increase in the stability of hydrogels formed through the crosslinking of polymers. The preparation of oxidized starch is proposed using a high-pressure synthesis reactor, where the best configuration was found to be at 200°C for 1.5 hours. For chitosan functionalized with cyanoguanidine, a high-pressure synthesis reactor was also used, and the best results were obtained when mixing 9.1% w/w of cyanoguanidine with chitosan. Finally, in the hydrogel formation, crosslinking was carried out in a water bath at 60°C for 1 hour. The optimal hydrogel formulation consisted of 50% oxidized starch and 50% functionalized chitosan in a weight ratio (% w/w). Analyses of carbonyl groups were conducted to select the best oxidized starch, swelling tests were performed to verify the stability of hydrogels, and encapsulation and release of acetaminophen were studied to assess their feasibility in pharmaceutical applications. FTIR analysis was conducted to confirm the oxidation and functionalization of the polymers, while SEM analysis was employed to analyze the morphology of the hydrogel, revealing the formation of honeycomb-like structures. In conclusion, the oxidation of starch, functionalization of chitosan with cyanoguanidine, and the formation of hydrogels were successfully achieved, demonstrating improved stability and the ability to perform controlled drug release.

Keywords: crosslinking, functionalized chitosan, oxidized starch, hydrogels, FTIR analysis, SEM analysis, acetaminophen.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	11
2. METODOLOGÍA	13
2.1. Preparación de almidón oxidado	13
2.1.1. Análisis de grupos carbonilos	13
2.2. Preparación quitosano funcionalizado con cianoguanidina	14
2.3. Preparación de hidrogeles	14
2.3.1. Prueba de hinchamiento	15
2.3.2. Encapsulación y liberación de acetaminofén	16
2.4. Análisis FTIR	17
2.5. Análisis SEM	17
2.6. Análisis estadístico	18
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES	19
3.1. Almidón oxidado	19
3.1.1. Análisis FTIR	19
3.1.2. Análisis de grupos carbonilos	22
3.2. Quitosano funcionalizado con cianoguanidina	23
3.2.1. Análisis FTIR	23
3.3. Hidrogeles	27
3.3.1. Análisis FTIR	27
3.3.2. Análisis por SEM	31

3.3.3.	Prueba de hinchamiento.....	32
3.3.4.	Encapsulación y liberación de acetaminofén.....	36
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
6.	ANEXOS.....	42
6.1.	Anexo A: Resultados Minitab: Análisis estadístico de cuantificación de grupos carbonilos	42
6.2.	Anexo B: Resultados Minitab: Análisis estadístico de pruebas de estabilidad (hinchamientos).....	44
6.3.	Anexo C: Resultados pruebas de estabilidad (Hinchamientos).....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Codificación Almidón oxidado a distintas condiciones de operación.....	13
Tabla 2. Codificación hidrogeles formados.	15
Tabla 3. Análisis de intensidad relativa almidón.....	19
Tabla 4. Resultados cuantificación grupos carbonilos [CO/100 GU].....	22
Tabla 5. Análisis de intensidad relativa quitosano	24
Tabla 6. Análisis intensidad relativa hidrogeles.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espectro FTIR de almidón nativo y almidón oxidado.	20
Figura 2. Espectro FTIR normalizado de almidón nativo y almidón oxidado.	21
Figura 3. Segunda derivada del espectro FTIR normalizado de almidón nativo y almidón oxidado en la región de 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1}	22
Figura 4. Espectro FTIR de quitosano nativo y quitosano funcionalizado con cianoguanidina.	25
Figura 5. Espectro FTIR normalizado de quitosano nativo y quitosano funcionalizado con cianoguanidina.	26
Figura 6. Segunda derivada del espectro FTIR normalizado de quitosano nativo y quitosano funcionalizado con cianoguanidina en la región de 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1}	27
Figura 7. Espectro FTIR de hidrogeles H ₉₋₅₀ y H ₁₇₋₅₀	29
Figura 8. Espectro FTIR normalizado de hidrogeles H ₉₋₅₀ y H ₁₇₋₅₀	30
Figura 9. Segunda derivada del espectro FTIR normalizado de hidrogeles H ₉₋₅₀ y H ₁₇₋₅₀ en la región de 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1}	31
Figura 10. Micrografía electrónica de barrido de H ₉₋₅₀	32
Figura 11. Resultados de prueba de estabilidad de controles Q: Aox, Q: A y QC: A.	33
Figura 12. Resultados de prueba de estabilidad de: a) H ₉₋₅₀ y b) H ₁₇₋₅₀	34
Figura 13. Resultados de prueba de liberación de a) H ₉₋₅₀ y b) H ₁₇₋₅₀	37
Figura 14. Hinchamientos para hidrogeles con 5% de Cianoguanidina y distintos porcentajes de quitosano	46
Figura 15. Hinchamientos para hidrogeles con 9% de Cianoguanidina y distintos porcentajes de quitosano	46
Figura 16. Hinchamientos para hidrogeles con 17% de Cianoguanidina y distintos porcentajes de quitosano	47

1. INTRODUCCIÓN

Los hidrogeles son materiales poliméricos creados a partir de materiales sintéticos o naturales [1], los cuales tienen la habilidad de hincharse y retener una gran fracción de agua dentro de su estructura, pero no se disuelven en agua. Esta habilidad de retener agua proviene de los grupos funcionales hidrofílicos que se encuentran conectados a la estructura polimérica mientras que su resistencia a la disolución proviene del entrecruzamiento entre las diferentes cadenas [2]. Actualmente, el uso de hidrogeles formados con materiales sintéticos es el más común debido a sus propiedades mecánicas, físicas y químicas, pero también tienen sus desventajas como: no son amigables con el medio ambiente, su producción no es rentable, no es renovable y difícil que realicen biodegradación[3]. Esto ha aumentado el interés sobre los hidrogeles de materiales naturales debido a que estos exceden donde su contraparte falla, por ejemplo: tienen la habilidad de biodegradación, estabilidad en químicos y biofluidos, configuración estable, biocompatibilidad, amigable con el medio ambiente y amplia capacidad de absorber metabolitos y nutrientes polares [4]. Debido a estas propiedades y métodos simples de preparación; los hidrogeles son ampliamente utilizados en los campos de biomedicina e ingeniería en aplicaciones como sistemas de liberación de medicamentos, lentes de contacto blandos, recubrimientos antiincrustantes, como también sensores, actuadores, y para tratamiento de aguas residuales [5].

La formación de hidrogeles se da a través de entrecruzamientos físicos o químicos. En el caso de los entrecruzamientos físicos la formación del hidrogel se da por las interacciones intermoleculares fuertes y débiles que se dan entre las cadenas de polímeros (enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, cristalización, etc.), mientras que para el caso del entrecruzamiento químico se forman enlaces covalentes entre los polímeros, debido a las reacciones entre los diferentes grupos funcionales complementarios presentes, o mediante la polimerización por radicales libres [5].

Para realizar hidrogeles de almidón-quitosano a través del entrecruzamiento físico, se realiza una mezcla de biopolímeros donde se juntan dos tipos distintos de polisacárido como el almidón y el quitosano para formar un hidrogel con excelentes propiedades mecánicas y biodegradabilidad controlable [3]. Este tipo de hidrogeles proviene de copolímeros injertados que se forman a través de interacciones hidrofóbicas, se injertan polímeros hidrofóbicos, como el quitosano, en polisacáridos, como el almidón y se calienta la solución polimérica para permitir la interacción de los componentes hidrofóbicos [5]. En el caso de entrecruzamiento químicos en los hidrogeles de almidón-quitosano, se pueden formar a través de la reacción de formación de bases de Schiff, la cual consiste en formar enlaces imino covalentes como producto de la reacción entre grupos amino y grupos aldehído [6]. Los grupos aldehído provienen de la oxidación del almidón y los grupos amino del quitosano.

El problema de este tipo de hidrogeles proviene de que los enlaces entre aminas primarias y aldehídos son reversibles, por lo que sufren de hidrólisis de manera rápida y como consecuencia tienen un tiempo de vida corto [7]. Debido a las aplicaciones de este tipo de hidrogeles como sistema para liberación de fármacos u otras aplicaciones biomédicas, se necesita una forma de mejorar la estabilidad de estos.

La solución propuesta en el presente trabajo es realizar una funcionalización previa del quitosano con cianogunidina para formar sitios de coordinación de grupos de biguanidina [8], los cuales deberían generar una base de Schiff más estable por resonancia. Esto permitiría formar un hidrogel a partir de almidón oxidado y un polímero de quitosano-cianoguanidina, el cual sería más estable que los creados previamente sin considerar la funcionalización del quitosano.

2. METODOLOGÍA

2.1. Preparación de almidón oxidado

Para preparar el almidón oxidado (Al. Ox) se realizó una solución 10% p/p de almidón de yuca y agua destilada, esta solución fue colocada en un reactor de síntesis de alta presión dentro de una mufla variando su temperatura y tiempo de reacción como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Codificación Almidón oxidado a distintas condiciones de operación

	Temperatura [°C]		
Tiempo [h]	170	200	230
0.5	Aox _{0.5-170}	Aox _{0.5-200}	Aox _{0.5-230}
1.5	Aox _{1.5-170}	Aox _{1.5-200}	Aox _{1.5-230}
2.5	Aox _{2.5-170}	Aox _{2.5-200}	Aox _{2.5-230}

2.1.1. Análisis de grupos carbonilos

Se realizó un protocolo modificado de Argüello [9] para realizar el análisis de grupos carbonilos, se preparó 4 g de muestra seca de almidón de yuca oxidado, y se disolvió en 100 ml de agua destilada, se calentó a punto de ebullición (100°C) por 30 min hasta que se gelatinizó, finalmente se dejó enfriar a temperatura ambiente. A continuación, se ajustó el pH a 3.2 con una solución 0.05 M de HCl, una vez completado se añadió 15 ml de una solución de cloruro de hidroxilamina HMC, que fue preparado con 25 g de HMC, 100 ml de 0.5 M NaOH y aforado a 500 ml. Se colocó la muestra en un baño maría con agitación por 4 h a 40°C. Una vez cumplido el tiempo designado, se vuelve a ajustar el pH a 3.2 de la misma forma realizada anteriormente. Se realiza un blanco con el mismo procedimiento, pero usando almidón de yuca comercial. El contenido de grupos carbonilos fue calculado usando la ecuación 1:

$$\%Carbonilo = \frac{[(blanco(ml) - muestra(ml)) \cdot 0.05 \cdot 0.028]}{peso\ muestra(g)} \quad [1]$$

Donde 0.05 es la molaridad de la solución de HCl y 0.028 es el factor de conversión del equivalente químico de un gramo de carbonilo (28) y la conversión de ml a L

2.2. Preparación quitosano funcionalizado con cianoguanidina

Se utilizó el protocolo modificado de Veisi[8], se preparó una solución de quitosano al 2% p/v en ácido acético al 1.5% v/v. Se añadió cianoguanidina al 4.8, 9.1 y 16.7 %p/p con relación al quitosano, sus codificaciones de aquí en adelante serán Q₅, Q₉ y Q₁₇ y finalmente se colocó la solución con ambos polímeros dentro de un reactor de síntesis de alta presión y dentro de la mufla a 90°C por 2 horas.

2.3. Preparación de hidrogeles

Para la preparación de los hidrogeles, se mezcló la solución quitosano funcionalizado con cianoguanidina con almidón oxidado con relación %p/p de 33.3%, 50.0% y 66.7% de quitosano respecto al almidón para una masa total de 2 g. Se colocó la muestra en un baño maría con agitación por 1 h a 60°C, una vez completado este proceso, se removió la parte acuosa que se encontraba en la muestra y se secó la parte sólida por 48 h a 40°C. Finalmente, la muestra seca se sumergió en etanol al 96% por 2 h, se retiró el etanol y se secó por 2 h a 60°C. En la tabla 2 se observa los experimentos realizados para la preparación de hidrogeles:

Tabla 2. Codificación hidrogeles formados.

	% Quitosano		
% Cianogunidina	33.3	50.0	66.7
4.8	H ₅₋₃₃	H ₅₋₅₀	H ₅₋₆₇
9.1	H ₉₋₃₃	H ₉₋₅₀	H ₉₋₆₇
16.7	H ₁₇₋₃₃	H ₁₇₋₅₀	H ₁₇₋₆₇

2.3.1. Prueba de hinchamiento.

Para realizar la prueba de hinchamiento, y se utilizó el protocolo propuesto por Quimbiamba[10]. Se sacó la muestra del horno una vez pasado el tiempo estipulado y se utilizó un mortero para reducir el tamaño de los hidrogeles. Se seleccionó un pedazo del hidrogel correspondiente y se pesó, la muestra fue luego cubierta en PBS, pH 7.4 y colocada en una incubadora a 37°C. Se pesó la muestra en peso mojado en el tiempo 1, 2, 3, 24, 48, 72 horas para obtener el porcentaje de hinchamiento y comprobar su estabilidad.

El hinchamiento fue calculado usando la ecuación 2:

$$\%H = \frac{m_t - m_o}{m_o} \times 100\% \quad [2]$$

Donde:

$\%H$ = porcentaje de hinchamiento

m_t = masa del hidrogel en el tiempo t

m_o = masa inicial del hidrogel

2.3.2. Encapsulación y liberación de acetaminofén.

Primero se preparó una solución de acetaminofén estándar (Sigma-Aldrich A3035) con una relación de %5 p/p con respecto a la mezcla polimérica. Se siguió el protocolo mencionado en la sección 2.3 y se sumergió el hidrogel seco dentro de la solución de acetaminofén por un tiempo total de 3 horas.

Para la liberación de acetaminofén, después de haber cumplido las 3 horas en la solución el hidrogel fue colocado directamente en 1 ml de PBS 7.4 pH y ubicado en una incubadora a 37°C. Se tomó alícuotas de 200 µl en tiempos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48 y 72 horas, las cuales fueron reemplazadas con PBS fresco inmediatamente. Para medir la concentración, se utilizó un método modificado de Quimbiamba [10], donde se midió la concentración usando el espectrofotómetro UV-vis Hanon i5 a 243 nm, donde las alícuotas de 200 µl fueron diluidas hasta 2 ml en solución fresca de PBS. Se preparó una curva de calibración utilizando el acetaminofén estándar, utilizando concentraciones conocidas, el porcentaje de fármaco liberado se calculó con la ecuación 3:

$$\%Lf = \frac{mf_t - mf_{t-1}}{mf_0} \times 100\% \quad [3]$$

Donde:

$\%Lf$ = porcentaje de liberación de fármaco

mf_t = masa del fármaco en el tiempo t

mf_{t-1} = masa acumulada de fármaco liberado

mf_0 = masa inicial del fármaco

2.4. Análisis FTIR

Para la caracterización de los distintos polímeros se realizó espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), se utilizó el “Cary 630 FTIR Spectrometer” de Agilent para realizar estos análisis.

Para el almidón oxidado, al final del procedimiento de la sección 2.1, el sólido es llevado a un horno a 40°C por 48h para secar la muestra, el análisis FTIR se realiza con la muestra seca y molida en partículas finas. En el caso del quitosano funcionalizado, se realiza el protocolo de la sección 2.2, seguido se coloca etanol 96% con una relación de la mitad del volumen de la solución de quitosano para precipitar el quitosano funcionalizado, después se realiza un total de tres lavados con una solución de etanol al 50% %v/v para quitar cianoguanidina que pueda seguir presente en la muestra y finalmente se coloca en el horno por a 40 °C por 15 horas; el análisis por FTIR se realiza con la muestra seca y molida en partículas finas. En el caso de hidrogeles, lo único que se necesita realizar es moler los hidrogeles en partículas finas para poder realizar en análisis por FTIR.

2.5. Análisis SEM

Para el análisis por microscopio electrónico de barrido o SEM por sus siglas en inglés para los hidrogeles, se realizó el procedimiento indicado en la sección 2.3 excepto que el paso final de secado se realizó esto mediando liofilizador para que las muestras sean aptas para ejecutar el análisis.

2.6. Análisis estadístico

Los análisis realizados se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos se reportan como el promedio \pm la desviación estándar. Para determinar diferencias estadísticamente significativas se realiza un análisis de varianza conocido como ANOVA, utilizando el método de comparación de pares por Tukey, para lo cual se va a utilizar un intervalo de confianza de 95% ($p < 0.05$)

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Almidón oxidado

Se realizó la oxidación del almidón utilizando la metodología propuesta en este trabajo, para comprobar la oxidación presente en los diferentes ensayos realizados, se realizó análisis FTIR y de grupos carbonilos de cada una de las muestras. A continuación, se presentan los resultados obtenidos.

3.1.1. Análisis FTIR

En la figura 1 se observan espectros FTIR en el rango de 600-2800 cm^{-1} que es donde se encuentran los picos relevantes que pueden sufrir cambios para los polímeros, donde uno de los espectros presentados es el almidón oxidado etiquetado como Aox_{1.5-200} usado y usado como ejemplo en esta sesión, siendo las condiciones de operación de esta oxidación 200°C por 1.5 horas y el segundo espectro es el almidón nativo sin oxidar (Etiquetado como “Control”). Se observa dos bandas características: la del grupo carbonilo (C=O) a 1640 cm^{-1} y la del grupo (C-O) 1000 cm^{-1} y para evaluar las posibles diferencias entre el control y el polímero oxidado se realiza un análisis de intensidad relativa para los espectros donde se divide el valor de la transmitancia para el número de onda mayor sobre el valor para el número de onda menor y los resultados se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Análisis de intensidad relativa almidón

Número de onda [cm^{-1}]	Control [%T]	Aox _{1.5-200} [%T]
1640	84.20	92.41
1000	27.16	59.49
Intensidad relativa	3.10	1.55

Se observa que la intensidad relativa del control es de 3.1 mientras que del Aox_{1.5-200} es de 1.55, lo que esto indica es el aumento de grupos carbonilos en el almidón oxidado en comparación al almidón nativo.

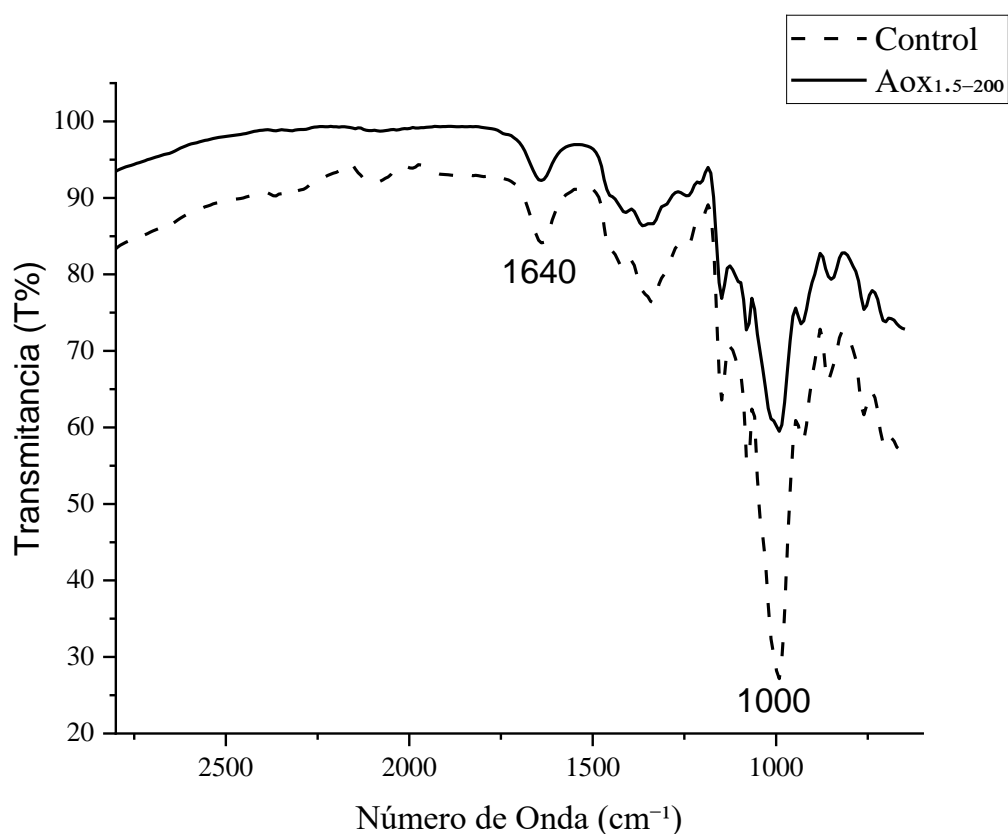


Figura 1. Espectro FTIR de almidón nativo y almidón oxidado.

De acuerdo con Gieroba [11], [12] existe otra forma de evidenciar el cambio en la banda de los grupos carbonilos mediante la normalización de los espectros IR con respecto a su banda de mayor intensidad. En la figura 2 se observa que en la banda de 1640 cm^{-1} , el espectro de AOX_{1.5-200} tiene una mayor intensidad que la del control, indicando el aumento de grupos carbonilos y corroborando el método anterior.

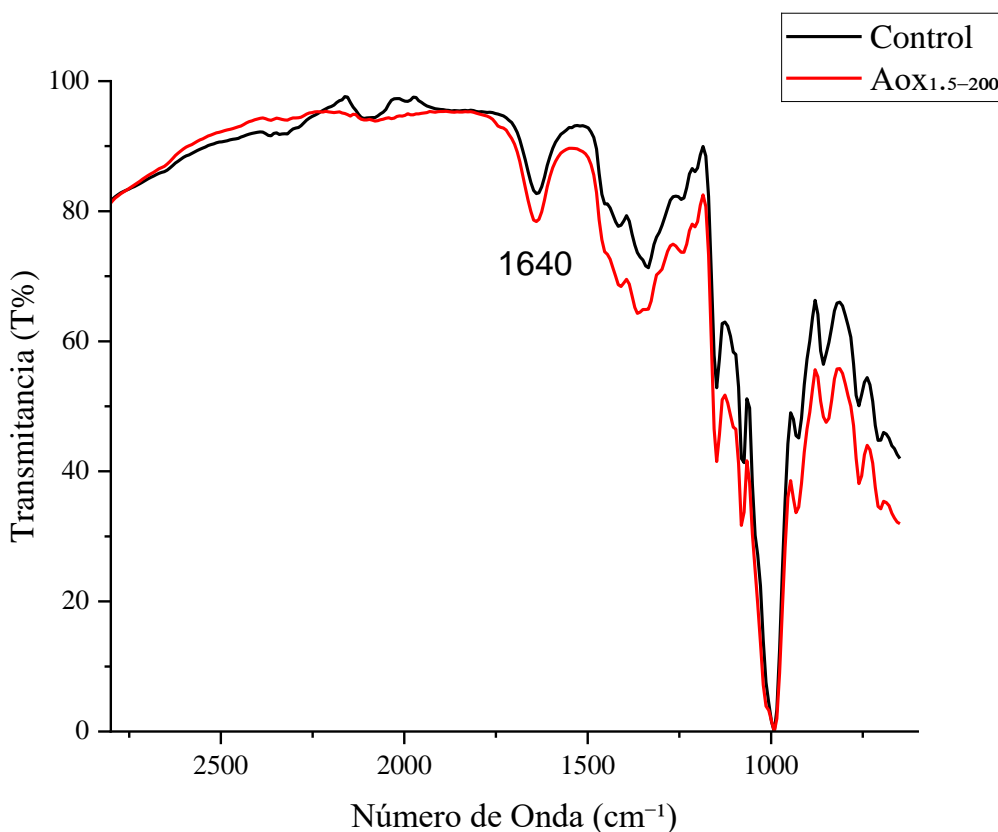


Figura 2. Espectro FTIR normalizado de almidón nativo y almidón oxidado.

Con los espectros una vez normalizados se puede obtener la segunda derivada de estos para investigar las modificaciones moleculares y alteraciones de estructuras secundarias en los polímeros. Se realiza este procedimiento para la zona de interés que es de 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} , donde se puede observar un movimiento del pico hacia números de onda mayores de 1640 cm^{-1} a 1650 cm^{-1} , esto indicaría la pérdida de enlaces de hidrógeno [13], en este caso sería debido a la oxidación que se realizó en el polímero que transformó el grupo (C-O-H) del almidón nativo a (C=O).

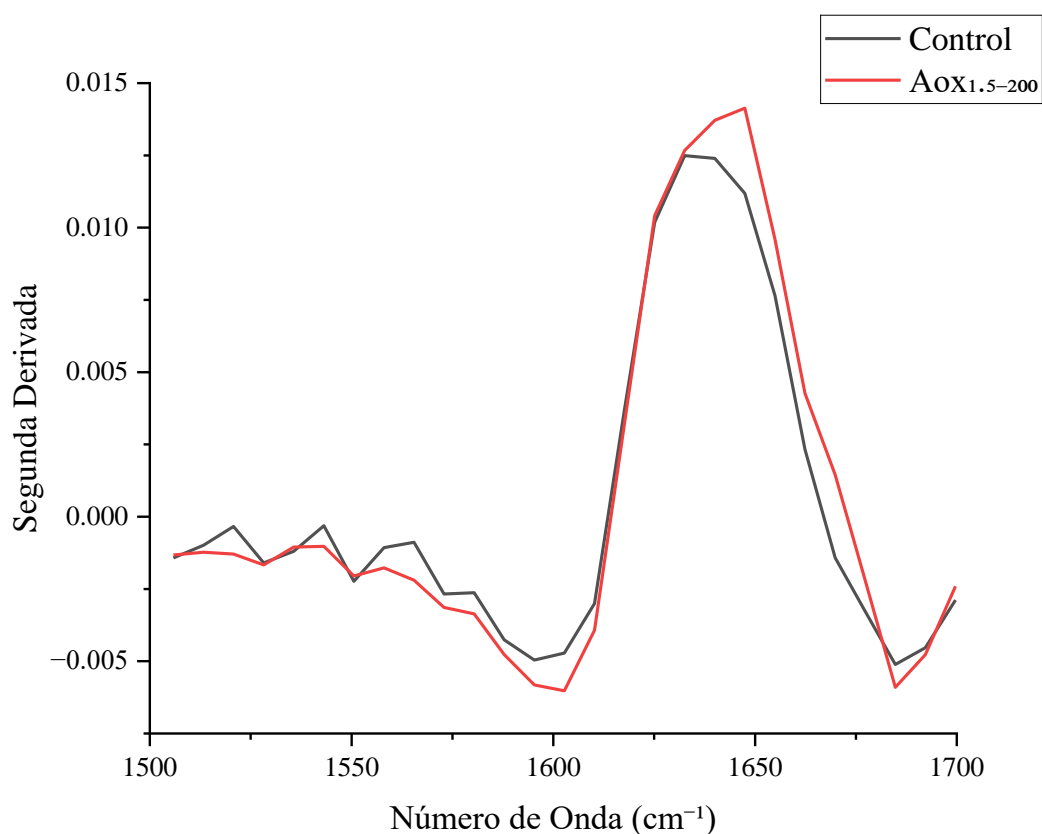


Figura 3. Segunda derivada del espectro FTIR normalizado de almidón nativo y almidón oxidado en la región de 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} .

3.1.2. Análisis de grupos carbonilos

Se realiza un segundo análisis para comprobar el aumento de grupos carbonilos en el almidón oxidado en comparación al almidón nativo, siguiendo la metodología descrita en la sección 2.1.1 se obtiene los resultados presentados en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados cuantificación grupos carbonilos [CO/100 GU]

Tiempo [h]	Temperatura [°C]		
	170	200	230
0.5	0.0315 ± 0.008	0.0525 ± 0.016	0.0805 ± 0.010
1.5	0.1225 ± 0.040	0.1855 ± 0.014	0.1680 ± 0.028

2.5	0.1575 ± 0.016	0.1470 ± 0.021	0.1260 ± 0.038
-----	--------------------	--------------------	--------------------

Con relación a los resultados de la cuantificación de grupos carbonilos donde se observa que el aumento de grupos carbonilos a medida que la temperatura y tiempo aumenta hasta un punto. Luego de este punto se observa una disminución en grupos carbonilos, hecho que se puede atribuir a que cuando la temperatura y el tiempo aumenta, la oxidación continua hasta formar grupos carboxilos y que pasado ciertas condiciones de operación, la muestra no se oxida, sino que se empieza a quemar. Usando el software MINITAB, se obtiene que el tiempo es un factor estadísticamente importante debido a que tiene un valor $p=0.000$ que es menor al valor $p=0.05$ del intervalo de confianza. Con el análisis de pares por Tukey se encuentra que 1.5 y 2.5 horas son estadísticamente iguales mientras 0.5 hora es el diferentes que una media menor que las otras dos. Debido a esto como 1.5 y 2.5 horas tienen medias mayores, se selecciona la muestra a 200°C por 1.5 h ($\text{Aox}_{1.5-200}$) ya que dentro de los resultados presentados en la tabla 4, es el que mayor cantidad de grupos carbonilos presenta. En el anexo A, se encuentra en mayor detalle los resultados recibidos de Minitab.

3.2. Quitosano funcionalizado con cianoguanidina

Se realizó la funcionalización del quitosano con cianoguanidina utilizando la metodología propuesta en este proyecto, para comprobar la funcionalización en los diferentes ensayos realizados, se realizó análisis FTIR.

3.2.1. Análisis FTIR

En la figura 2 se observan espectros FTIR en el rango de $600\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ que es donde se encuentran los picos relevantes de los polímeros donde uno de los espectros presentados es el quitosano funcionalizado con cianoguanidina que en este ejemplo es el Q₉ que indica que el 9% de la masa es cianoguanidina y el segundo espectro es el quitosano nativo sin funcionalizar.

No se encuentra una banda en 2100 cm^{-1} lo que indica que no hay presencia de grupos nitrilos, que significa que el lavado realizado para eliminar cianoguanidina sin reaccionar fue exitoso. Se observa dos bandas características: la del grupo imina a 1600 cm^{-1} y la del grupo (C-O) 1000 cm^{-1} para evidenciar la diferencia entre el control y el polímero funcionalizado se realiza un análisis de intensidad relativa para los espectros donde se divide el valor de la transmitancia del número de onda mayor sobre el valor del número de onda menor., esto se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Análisis de intensidad relativa quitosano

Número de onda [cm^{-1}]	Control [%T]	Q₉ [%T]
1600	84.20	92.41
1000	53.21	76.86
Intensidad relativa	1.61	1.23

Se observa que la intensidad relativa del control es de 1.61 mientras que del Q₉ es de 1.23, lo que esto indica es el aumento de grupos aminos en el quitosano funcionalizado en comparación al quitosano nativo.

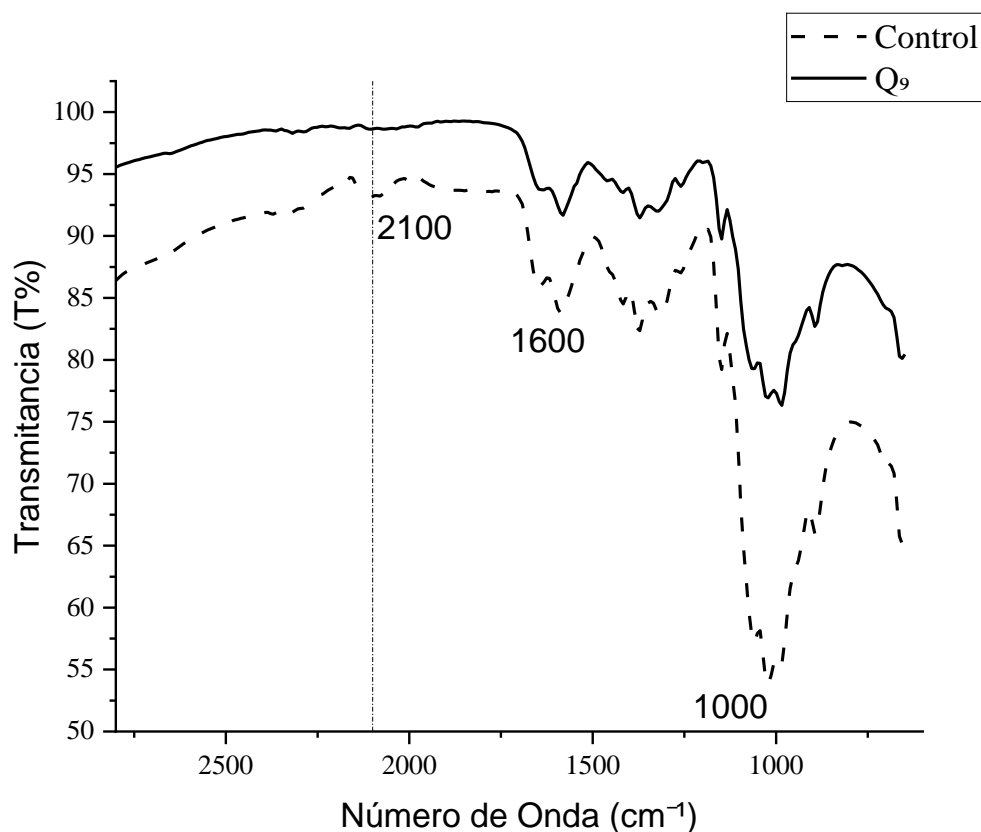


Figura 4. Espectro FTIR de quitosano nativo y quitosano funcionalizado con cianoguanidina.

Siguiendo el método de Gieroba [11], [12] existe otra forma de evidenciar el cambio en la banda de los grupos imino mediante la normalización de los espectros IR con respecto a su banda de mayor intensidad. En la figura 5 se observa que en la banda de 1600 cm⁻¹, el espectro de Q₉ tiene una mayor intensidad que la del control, indicando el aumento de grupos aminos y corroborando el método anterior.

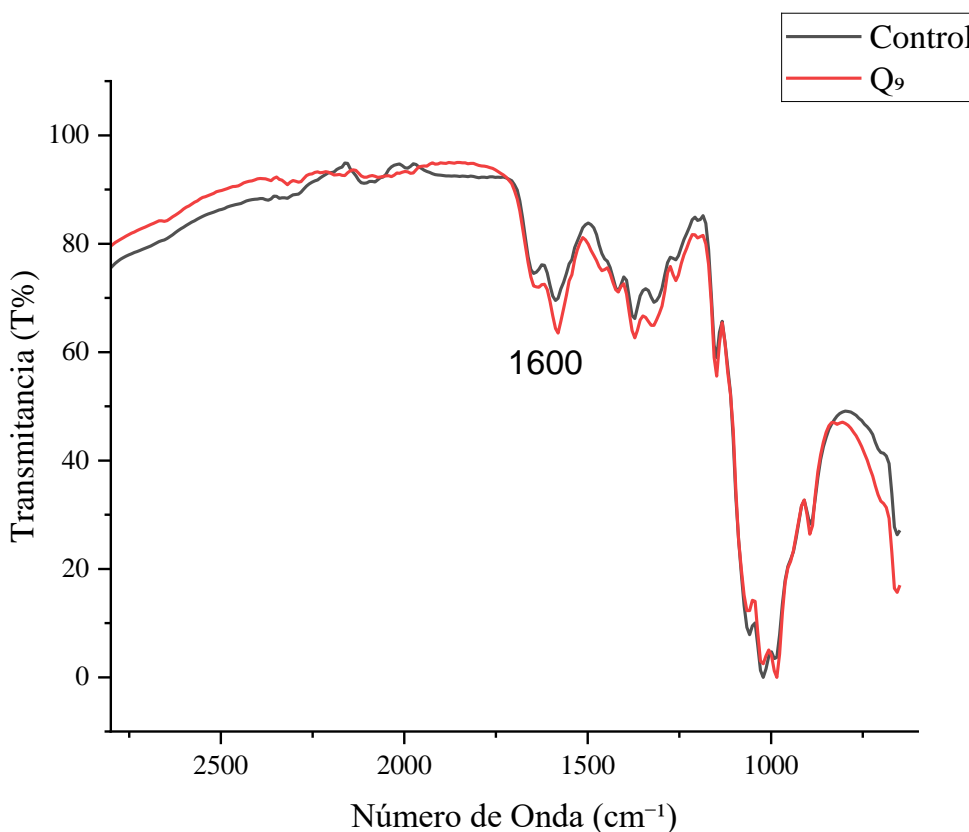


Figura 5. Espectro FTIR normalizado de quitosano nativo y quitosano funcionalizado con cianoguanidina.

Con los espectros una vez normalizados se puede obtener la segunda derivada de estos para investigar las modificaciones moleculares y alteraciones de estructuras secundarias en los polímeros. Se realiza este procedimiento para la zona de interés que es de 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} , donde se puede observar un movimiento del pico hacia números de onda menores de 1600 cm^{-1} a 1580 cm^{-1} , aunque esto indicaría la pérdida de enlaces de hidrógeno [13], debido a que sigue encontrándose en la región del FTIR para el grupo imina, se toma en cuenta que su pendiente es mucho más pronunciada lo cual se relacionaría un aumento de este tipo de grupos funcionales lo cual a su vez indica el incremento de bases de Schiff debido a la funcionalización.

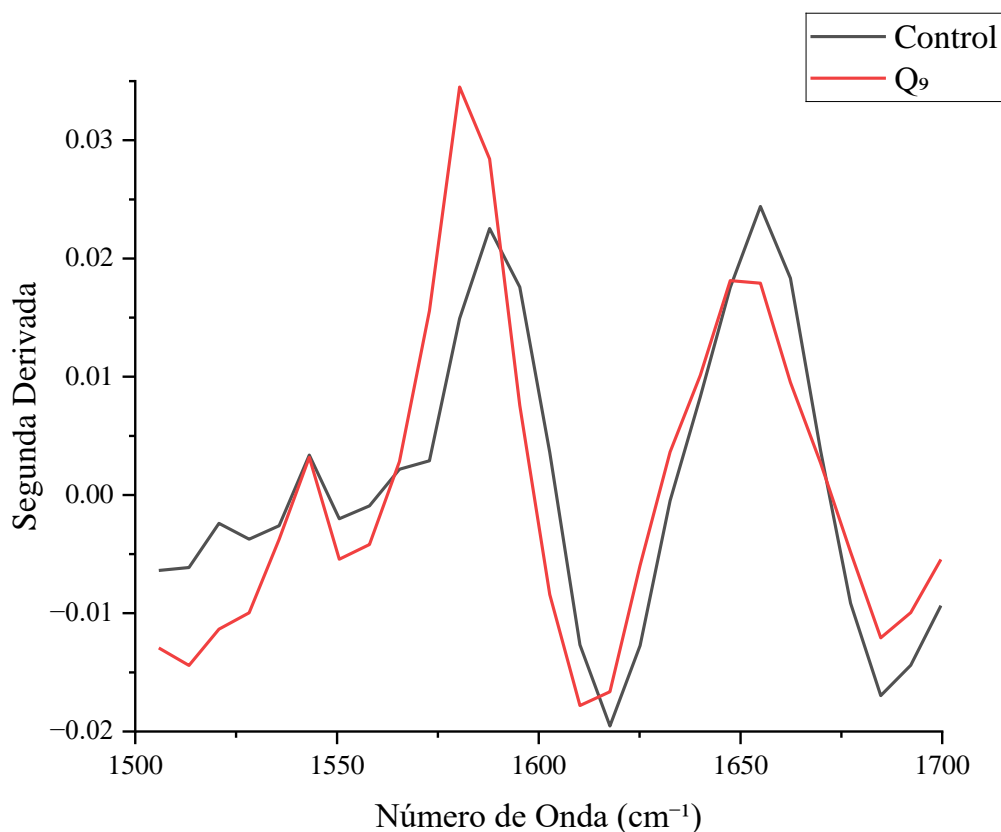


Figura 6. Segunda derivada del espectro FTIR normalizado de quitosano nativo y quitosano funcionalizado con cianoguanidina en la región de 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} .

3.3. Hidrogeles

Se formó hidrogeles mediante el entrecruzamiento de almidón oxidado y quitosano funcionalizado utilizando la metodología propuesta, para comprobar la funcionalización en los diferentes ensayos realizados, se realizó análisis FTIR. Para caracterizar la morfología se realizó un análisis por SEM, para comprobar su estabilidad se realizó pruebas de hinchamiento y para corroborar su aplicación en farmacología se realizaron pruebas de liberación de fármacos.

3.3.1. Análisis FTIR

En la figura 3 se observan espectros FTIR en el rango de $600\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ que es donde se encuentran los picos relevantes de los polímeros donde ambos espectros presentados son hidrogeles formados a partir del entrecruzamiento. No se encuentra una banda en 2100 cm^{-1} lo

que indica que no hay presencia de grupos nitrilos, que significa que el lavado realizado para eliminar cianoguanidina sin funcionalizar fue exitoso. Se observa dos bandas características: la del grupo imina y carbonilo a 1640 cm^{-1} y la del grupo (C-O) a 1000 cm^{-1} , las cuales indican el entrecruzamiento exitoso de los polímeros. Para evidenciar la diferencia del entrecruzamiento entre los hidrogeles H₉₋₅₀ y H₁₇₋₅₀ control y el polímero funcionalizado se realiza un análisis de intensidad relativa para los espectros donde se divide el valor de la transmitancia del número de onda mayor sobre el valor del número de onda menor., esto se observa en la tabla 6.

Tabla 6. Análisis intensidad relativa hidrogeles.

Número de onda [cm^{-1}]	H₉₋₅₀ [%T]	H₁₇₋₅₀ [%T]
1640	90.29	85.16
1000	61.82	33.17
Intensidad relativa	1.46	2.57

Se observa que la intensidad relativa del hidrogel H₉₋₅₀ es de 1.46 mientras que del hidrogel H₁₇₋₅₀ es de 2.57, lo que esto indica es un mayor entrecruzamiento y presencia de grupos aminos en el hidrogel H₉₋₅₀ en comparación al H₁₇₋₅₀.

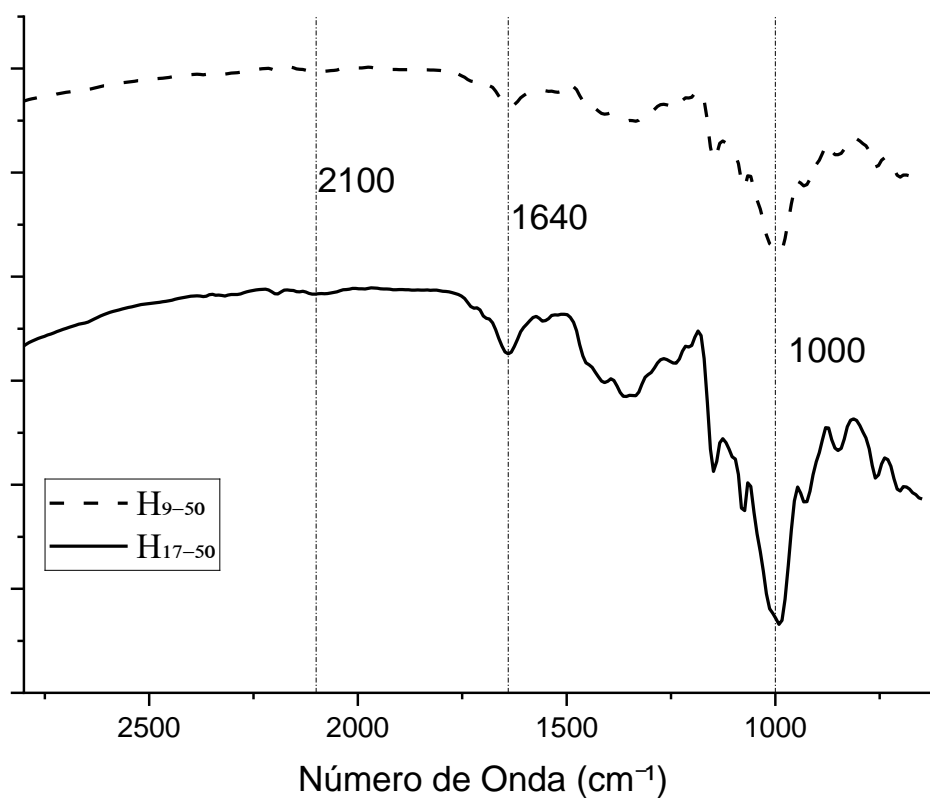


Figura 7. Espectro FTIR de hidrogeles H₉₋₅₀ y H₁₇₋₅₀

Utilizando el método de Gieroba [11], [12] para evidenciar el cambio en la banda de los grupos carbonilos y aminos mediante la normalización de los espectros IR con respecto a su banda de mayor intensidad. En la figura 8 se observa que en la banda de 1640 cm⁻¹, el espectro del hidrogel H₉₋₅₀ tiene una mayor intensidad que la del hidrogel H₁₇₋₅₀, indicando una mayor cantidad de grupos carbonilos y aminos.

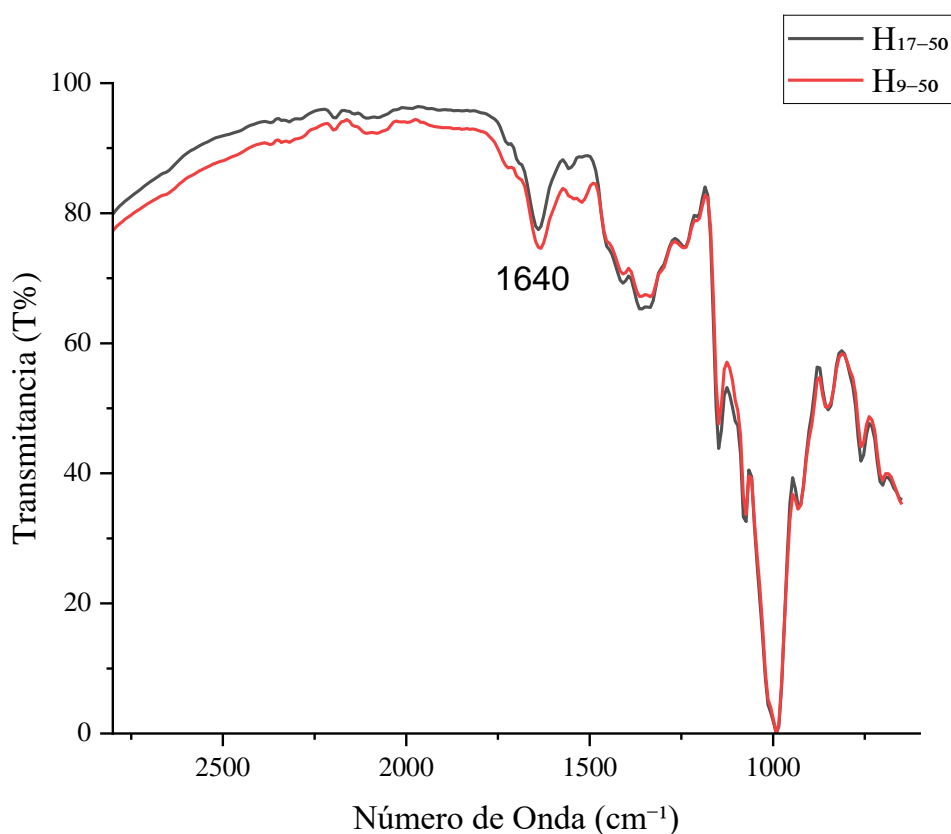


Figura 8. Espectro FTIR normalizado de hidrogeles H9-50 y H17-50

Con los espectros una vez normalizados se puede obtener la segunda derivada de estos para investigar las modificaciones moleculares y alteraciones de estructuras secundarias en los polímeros. Se realiza este procedimiento para la zona de interés que es de 1500 cm⁻¹ a 1700 cm⁻¹, donde ambos picos se encuentran movidos hacia números de onda mayores, alrededor de 1655 cm⁻¹ en comparación a la banda original de 1640 cm⁻¹, lo cual comprueba el incremento de enlaces de hidrógeno [13] que son la base fundamental de las bases de Schiff [14], confirmando un entrecruzamiento exitoso.

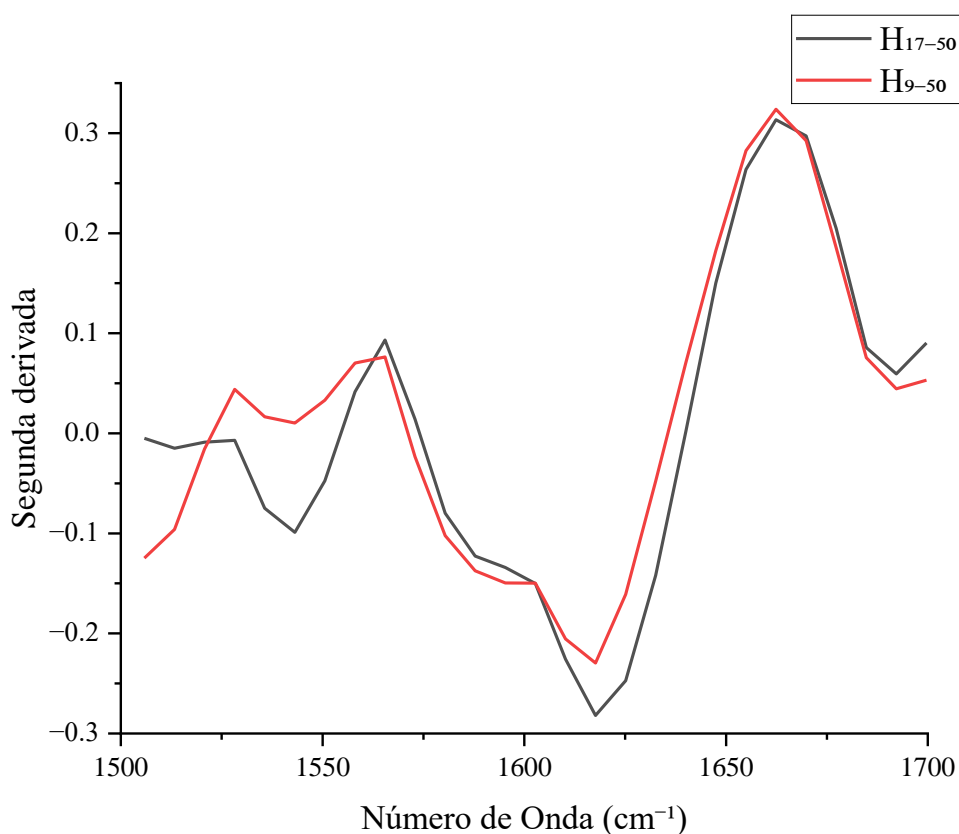


Figura 9. Segunda derivada del espectro FTIR normalizado de hidrogeles H₉₋₅₀ y H₁₇₋₅₀ en la región de 1500 cm⁻¹ a 1700 cm⁻¹.

3.3.2. Análisis por SEM

Se utiliza el microscopio electrónico de barrido para estudiar la morfología de los hidrogeles formados, en la figura 4 se observa el hidrogel H9-50 como ejemplo de los demás hidrogeles. Se observa que la estructura del hidrogel es porosa con forma similar a la de un panal de abejas, estudios previos han demostrado que la presencia de este tipo de estructuras puede ser debido a la presencia de cadenas entrecruzadas donde se estabiliza agua condensada [15]–[18]. Se observa que el diámetro de los poros es mayor a 50 μm en algunos casos, hidrogeles con este tipo de estructura y tamaño tienen la posibilidad de realizar liberación de fármacos de moléculas grandes como proteínas[19].

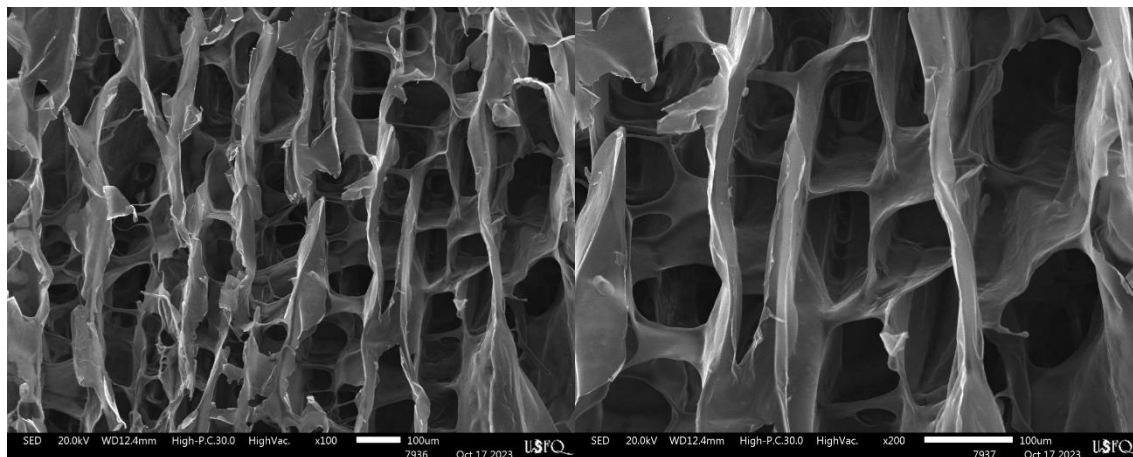


Figura 10. Micrografía electrónica de barrido de H₉₋₅₀

3.3.3. Prueba de hinchamiento

Las pruebas de hinchamiento son realizadas para comprobar la estabilidad de los hidrogeles con los que se está trabajando, se ejecutó este procedimiento para los nueve tipos de hidrogel sintetizados de los cuales se muestra los mejores, los cuales fueron obtenidos mediante un análisis ANOVA y de pares de Tukey, estos pueden ser observados en la figura 12a y 12b. Al mismo tiempo se realizó la misma prueba con tres controles donde al menos uno de los estaba en su estado nativo, las nomenclaturas usadas para estos controles son: Q para quitosano nativo, QC para quitosano funcionalizado, A para almidón nativo y Aox para almidón oxidado; esto se observa en la figura 11.

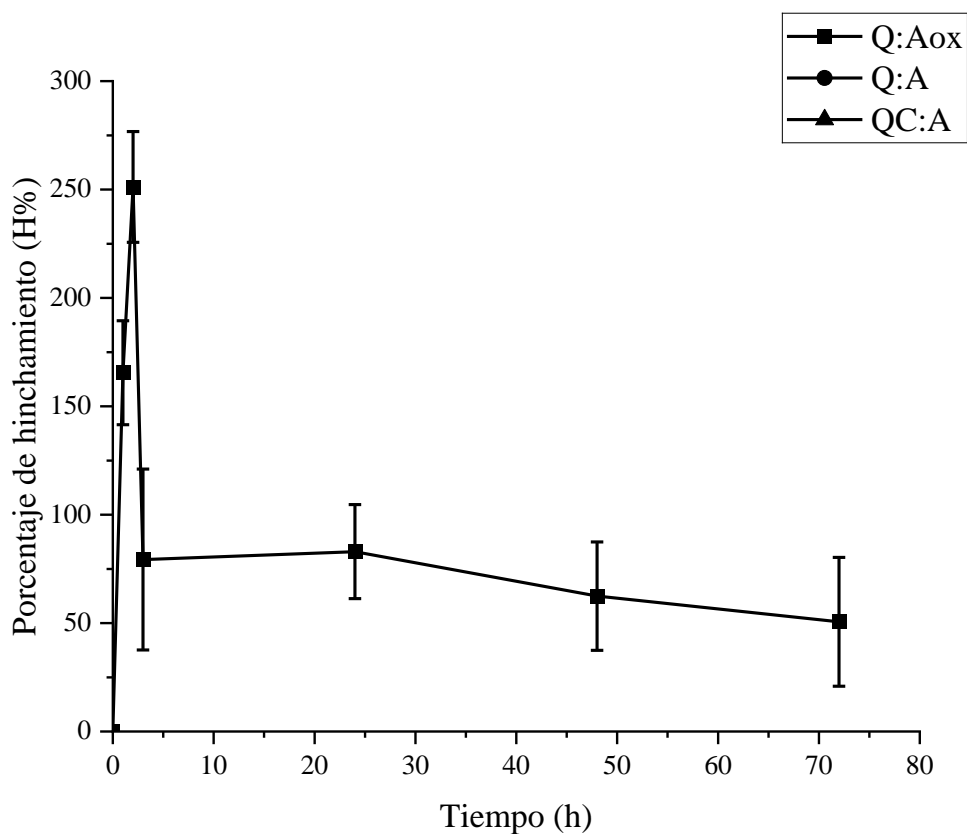


Figura 11. Resultados de prueba de estabilidad de controles Q: Aox, Q: A y QC: A.

Se observa en la figura 11 que los controles donde no se utilizó almidón oxidado ni siquiera lograron llegar a la primera hora del hinchamiento antes de empezar a degradarse, esto sirve como otro método para comprobar la oxidación exitosa del almidón por la metodología propuesta. Por otro lado, el control Q: Aox que si contenía almidón oxidado presenta hinchamiento hasta las 72 horas, pero después de la segunda hora se da una degradación importante, lo cual ayuda a demostrar la inestabilidad de las bases de Schiff[7].

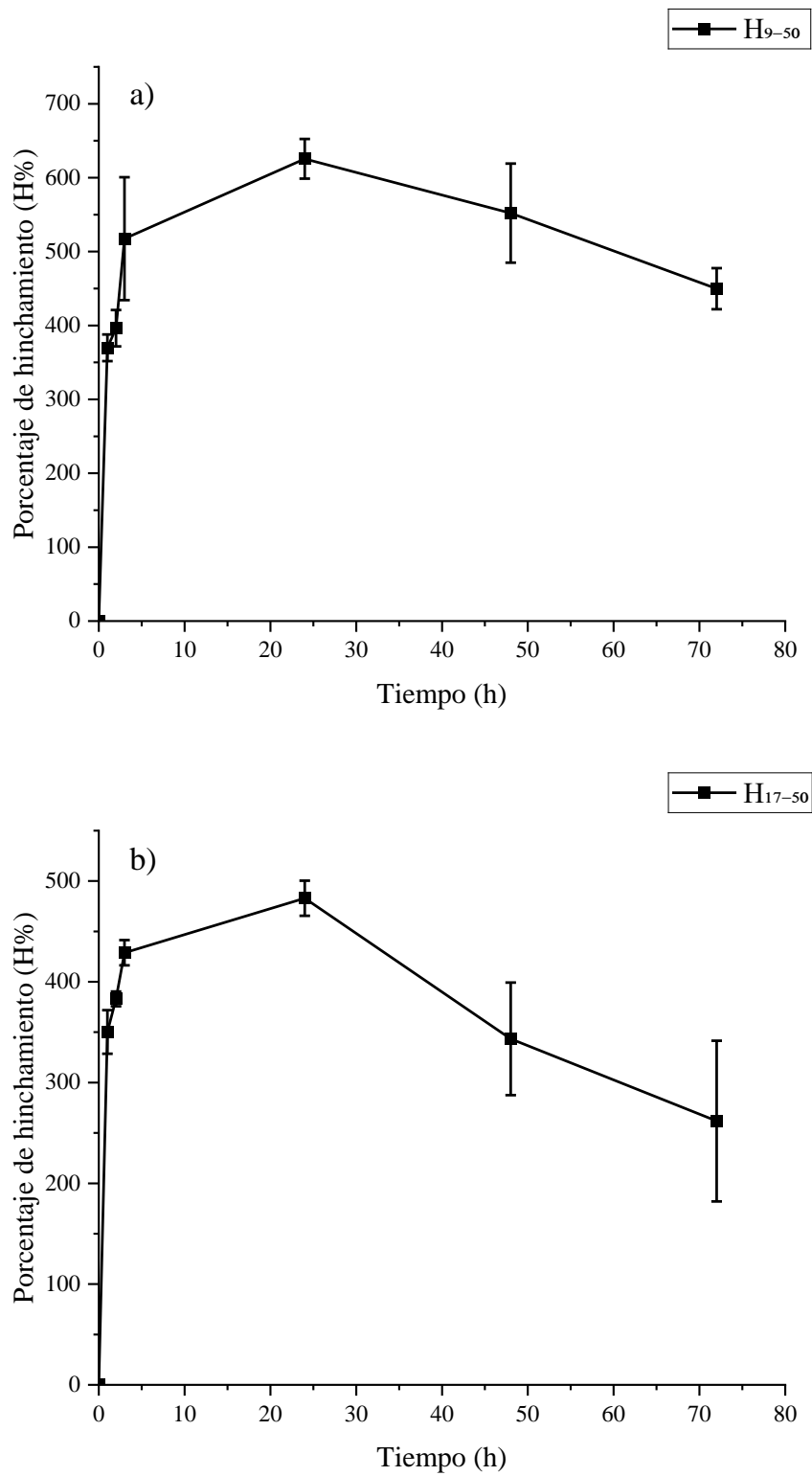


Figura 12. Resultados de prueba de estabilidad de: a) H₉₋₅₀ y b) H₁₇₋₅₀

Se utiliza el software Minitab para realizar un análisis ANOVA de los resultados de las pruebas de estabilidad, de lo cual se obtiene que tanto el tiempo como el porcentaje de cianoguanidina son factores estadísticamente importantes con un valor $p=0.000$ que es menor al valor $p=0.05$ del intervalo de confianza. Se realiza un análisis de pares de Tukey en el cual se obtiene que los tiempos 1, 2 y 3 horas son iguales, 3 y 24 horas y finalmente 1 y 72 horas; esto puede ser explicado porque tanto las primeras tres medidas son todas realizadas en el primer día, en el caso de las 3 y 24 horas esto es debido a que en la mayoría de estos casos a la tercera hora se obtiene el porcentaje de hinchamiento máximo y las 24 horas este solo ha disminuido muy poco y finalmente para las 1 y 72 horas la relación entre estas es debido a que con la degradación que se presenta en los hidrogeles muchos terminan en el último día con un valor similar al de la primera hora del primer día. El porcentaje de quitosano en cada una de las muestras fue significativo con un valor $p=0.023$ que es menor al valor $p=0.05$ del intervalo de confianza, en el análisis por pares de Tukey se obtiene que 33% y 50% son estadísticamente iguales y también que 50% y 67% son estadísticamente iguales. El porcentaje de cianoguanidina fue un factor significativo donde cada uno de los niveles es estadísticamente diferente al otro, debido a esto para seleccionar los mejores hidrogeles para la prueba de liberación se decide descartar los de 4.9% de cianoguanidina debido a que presentan la mayor degradación y para los hidrogeles con 9.1 % y 16.7 % de cianoguanidina se toma el hidrogel con 50% de quitosano. En el anexo B, se encuentra en mayor detalle los resultados recibidos de Minitab.

En la figura 12 se observa los resultados de las pruebas de estabilidad para los hidrogeles H_{9-50} y H_{17-50} , donde en la figura 12a para el hidrogel H_{9-50} se obtiene un porcentaje de hinchamiento máximo es aproximadamente de 650% mientras que en la figura 12b del

hidrogel H₁₇₋₅₀ el porcentaje de hinchamiento máximo es de casi 500%. Esto nos indica que a mayor cantidad de cianoguanidina presente, el hinchamiento será más controlado, pero a su vez la degradación será más rápida. En el anexo C, se encuentra en mayor detalle los resultados de las pruebas de hinchamiento para la estabilidad de los hidrogeles.

3.3.4. Encapsulación y liberación de acetaminofén

La encapsulación y liberación de acetaminofén fue realizado solo con los mejores hidrogeles de las pruebas de estabilidad que fueron H₉₋₅₀ y H₁₇₋₅₀, los resultados pueden ser observados en las figuras 7a y 7b.

Para el hidrogel H₉₋₅₀, se observa que la liberación máxima es del 80% del acetaminofén encapsulado y a partir de las 24 horas la liberación se mantiene estable. Mientras que en el caso del hidrogel H₁₇₋₅₀, la liberación máxima es del 70% del acetaminofén encapsulado pero la liberación nunca se mantiene estable. Esta diferencia se puede relacionar con los análisis de liberación donde el hidrogel H₁₇₋₅₀ presenta un porcentaje de hinchamiento menor en comparación al hidrogel H₉₋₅₀. Otro motivo para esta diferencia en los resultados de la liberación puede deberse a que en el momento de realizar el encapsulamiento de los hidrogeles se observa que la cantidad de solución con acetaminofén que se queda sin absorber es mayor en el caso del hidrogel H₁₇₋₅₀ en comparación al hidrogel H₉₋₅₀, lo que indicaría una capacidad menor de encapsulamiento y a su vez de liberación.

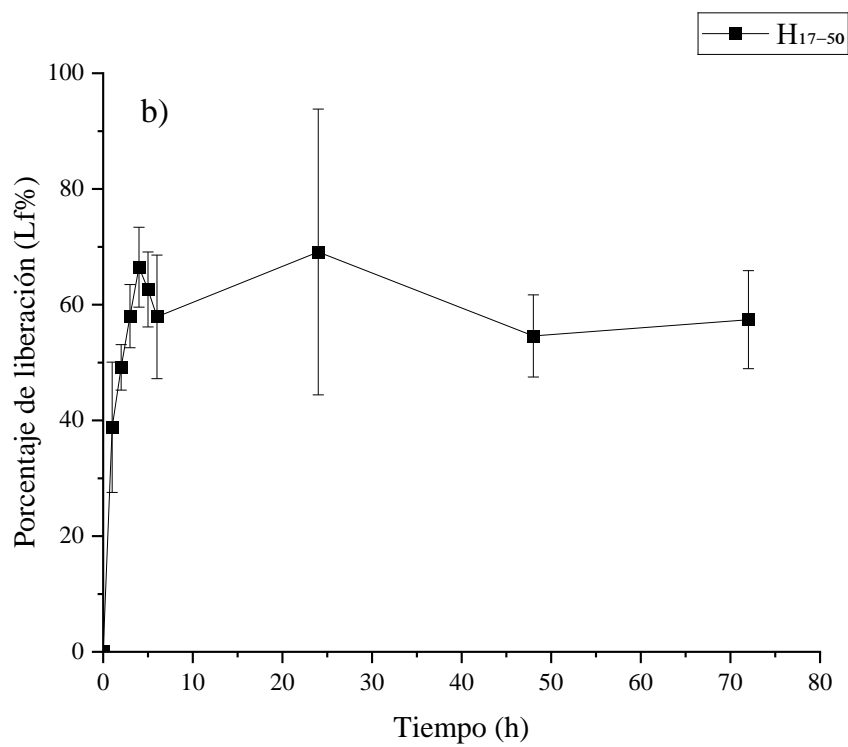
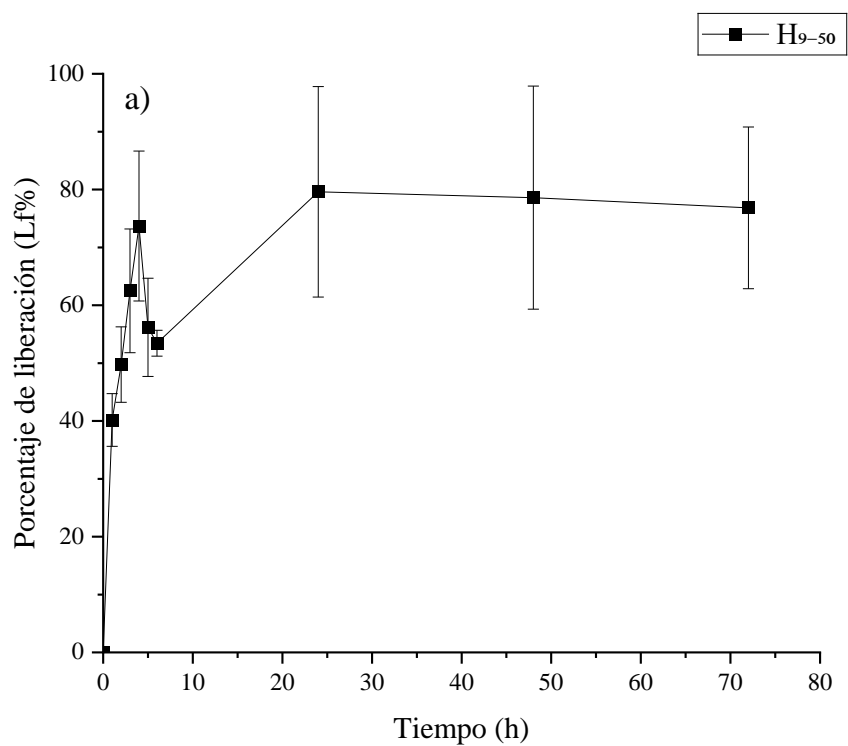


Figura 13. Resultados de prueba de liberación de a) H₉₋₅₀ y b) H₁₇₋₅₀

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Después de finalizar el presente proyecto se obtuvo las siguientes conclusiones con respeto a los objetivos planteados originalmente. Primero, la oxidación y caracterización del almidón mediante los métodos propuestos fue exitosa, de esto se obtuvo que la mejor configuración para realizar el proceso de oxidación es a 200°C por 1.5 h. Segundo, la funcionalización y caracterización del quitosano con cianoguanidina fue de igual manera exitosa, la mejor relación %p/p entre los polímeros fue de 9.1% de cianoguanidina en relación con el quitosano, para obtener este resultado se necesitó completar las pruebas para los hidrogeles. Finalmente, la formación y caracterización de hidrogeles mediante el entrecruzamiento del almidón oxidado y el quitosano funcionalizado con cianoguanidina fue exitoso, de lo cual se obtuvo que el hidrogel H₉₋₅₀ fue el mejor entre todas las formulaciones, debido a que tuvo menor degradación dentro de las 72 horas que duró el análisis, tuvo un mayor porcentaje de hinchamiento de alrededor de 650% y una mejor capacidad de liberación de acetaminofén donde pudo liberar 80% del fármaco encapsulado.

Una observación mayor que se realiza a este proyecto es en el proceso de formar el hidrogel, donde en el procedimiento utilizado el lavado con etanol se da al final una vez que el secado ha sido completado. Para un proyecto que de continuación a este se recomienda precipitar el quitosano con etanol, realizar el lavado con etanol del precipitado y volver a disolver el quitosano antes de mezclarlo con el almidón. Esto serviría para eliminar toda la cianoguanidina sin funcionalizar que queda dentro de la solución de quitosano, durante el proyecto se observó que la cianoguanidina sin funcionalizar tiene una relación directa con el proceso de degradación del hidrogel, al cambiar el procedimiento de formación se espera la estabilidad de los hidrogeles obtenidos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] F. Ullah, M. B. H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, y H. M. Akil, “Classification, processing and application of hydrogels: A review”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 57. Elsevier Ltd, pp. 414–433, el 1 de diciembre de 2015. doi: 10.1016/j.msec.2015.07.053.
- [2] E. M. Ahmed, “Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review”, *Journal of Advanced Research*, vol. 6, núm. 2. Elsevier B.V., pp. 105–121, 2015. doi: 10.1016/j.jare.2013.07.006.
- [3] M. Qamruzzaman, F. Ahmed, y M. I. H. Mondal, “An Overview on Starch-Based Sustainable Hydrogels: Potential Applications and Aspects”, *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 30, núm. 1. Springer, pp. 19–50, el 1 de enero de 2022. doi: 10.1007/s10924-021-02180-9.
- [4] S. Kalia y M. W. Sabaa Editors, “Polysaccharide Based Graft Copolymers”.
- [5] W. Wang, R. Narain, y H. Zeng, “Hydrogels”, en *Polymer Science and Nanotechnology: Fundamentals and Applications*, Elsevier, 2020, pp. 203–244. doi: 10.1016/B978-0-12-816806-6.00010-8.
- [6] J. Xu, Y. Liu, y S. hui Hsu, “Hydrogels based on schiff base linkages for biomedical applications”, *Molecules*, vol. 24, núm. 16. MDPI AG, el 19 de agosto de 2019. doi: 10.3390/molecules24163005.
- [7] X. Ding, G. Li, C. Xiao, y X. Chen, “Enhancing the Stability of Hydrogels by Doubling the Schiff Base Linkages”, *Macromol Chem Phys*, vol. 220, núm. 3, feb. 2019, doi: 10.1002/macp.201800484.
- [8] H. Veisi, M. Ghadermazi, y A. Naderi, “Biguanidine-functionalized chitosan to immobilize palladium nanoparticles as a novel, efficient and recyclable heterogeneous

- nanocatalyst for Suzuki-Miyaura coupling reactions”, *Appl Organomet Chem*, vol. 30, núm. 5, pp. 341–345, may 2016, doi: 10.1002/aoc.3437.
- [9] E. Argüello-García, J. Solorza-Feria, J. R. Rendón-Villalobos, F. Rodríguez-González, A. Jiménez-Pérez, y E. Flores-Huicochea, “Properties of edible films based on oxidized starch and zein”, *Int J Polym Sci*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/292404.
- [10] M. Gabriela, Q. Garzón, N. Del Profesor, T. Académico, J. Álvarez, y J. Mora, “Formación de hidrogeles de pectina y quitosano utilizando ácido succínico como agente entrecruzante para la liberación controlada de acetaminofén”, 2022. [En línea]. Disponible en: <http://bit.ly/COPETheses>.
- [11] B. Gieroba *et al.*, “The FT-IR and raman spectroscopies as tools for biofilm characterization created by cariogenic streptococci”, *Int J Mol Sci*, vol. 21, núm. 11, jun. 2020, doi: 10.3390/ijms21113811.
- [12] B. Gieroba *et al.*, “Effect of gelation temperature on the molecular structure and physicochemical properties of the curdlan matrix: Spectroscopic and microscopic analyses”, *Int J Mol Sci*, vol. 21, núm. 17, pp. 1–18, sep. 2020, doi: 10.3390/ijms21176154.
- [13] S. Kudo y S. Nakashima, “Changes in IR band areas and band shifts during water adsorption to lecithin and ceramide”, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 228, mar. 2020, doi: 10.1016/j.saa.2019.117779.
- [14] K. M. Krupka, M. Pocheć, J. J. Panek, y A. Jezierska, “Comprehensive Empirical Model of Substitution—Influence on Hydrogen Bonding in Aromatic Schiff Bases”, *Int J Mol Sci*, vol. 23, núm. 20, oct. 2022, doi: 10.3390/ijms232012439.

- [15] V. T. Bui, H. S. Lee, J. H. Choi, y H. S. Choi, “Data from crosslinked PS honeycomb thin film by deep UV irradiation”, *Data Brief*, vol. 5, pp. 990–994, 2015, doi: 10.1016/j.dib.2015.11.012.
- [16] Y. Dou, M. Jin, G. Zhou, y L. Shui, “Breath Figure Method for Construction of Honeycomb Films”, *Membranes (Basel)*, vol. 5, núm. 3, pp. 399–424, ago. 2015, doi: 10.3390/membranes5030399.
- [17] C. X. Cheng, Y. Tian, Y. Q. Shi, R. P. Tang, y F. Xi, “Porous Polymer Films and Honeycomb Structures Based on Amphiphilic Dendronized Block Copolymers”, *Langmuir*, vol. 21, núm. 14, pp. 6576–6581, jul. 2005, doi: 10.1021/la050187d.
- [18] M. H. Alotaibi, G. A. El-Hiti, H. Hashim, A. S. Hameed, D. S. Ahmed, y E. Yousif, “SEM analysis of the tunable honeycomb structure of irradiated poly(vinyl chloride) films doped with polyphosphate”, *Heliyon*, vol. 4, núm. 12, p. e01013, dic. 2018, doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e01013.
- [19] X. Sun *et al.*, “Development of a hybrid gelatin hydrogel platform for tissue engineering and protein delivery applications”, *J Mater Chem B*, vol. 3, núm. 30, pp. 6368–6376, ago. 2015, doi: 10.1039/c5tb00645g.

6. ANEXOS

6.1. Anexo A: Resultados Minitab: Análisis estadístico de cuantificación de grupos carbonilos

General Linear Model: 100 CO/GU versus Temperatura; Tiempo

Method

Factor coding (-1; 0; +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Temperatura	Fixed	3	170; 200; 230
Tiempo	Fixed	3	0.5; 1.5; 2.5

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Temperatura	2	0.002507	0.001254	1.47	0.252
Tiempo	2	0.054692	0.027346	32.00	0.000
Error	22	0.018800	0.000855		
Lack-of-Fit	4	0.009106	0.002276	4.23	0.014
Pure Error	18	0.009694	0.000539		
Total	26	0.075999			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0292325	75.26%	70.77%	62.74%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	0.11744	0.00563	20.88	0.000	
Temperatura					
170	-0.01361	0.00796	-1.71	0.101	1.33
200	0.00622	0.00796	0.78	0.443	1.33
Tiempo					
0.5	-0.06261	0.00796	-7.87	0.000	1.33
1.5	0.04122	0.00796	5.18	0.000	1.33

Regression Equation

$$100 \text{ CO/GU} = 0.11744 - 0.01361 \text{ Temperatura}_{170} + 0.00622 \text{ Temperatura}_{200} \\ + 0.00739 \text{ Temperatura}_{230} - 0.06261 \text{ Tiempo}_{0.5} + 0.04122 \text{ Tiempo}_{1.5} \\ + 0.02139 \text{ Tiempo}_{2.5}$$

Fits and Diagnostics for Unusual Observations

Obs	100 CO/GU	Fit	Resid	Std Resid	
4	0.0825	0.1451	-0.0626	-2.37	R
25	0.0880	0.1462	-0.0582	-2.21	R

R Large residual

Comparisons for 100 CO/GU**Tukey Pairwise Comparisons: Response = 100 CO/GU, Term = Temperatura**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Temperatura	N	Mean	Grouping
230	9	0.124833	A
200	9	0.123667	A
170	9	0.103833	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs**Tukey Pairwise Comparisons: Response = 100 CO/GU, Term = Tiempo**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tiempo	N	Mean	Grouping
1.5	9	0.158667	A
2.5	9	0.138833	A
0.5	9	0.054833	B

Means that do not share a letter are significantly different.

6.2. Anexo B: Resultados Minitab: Análisis estadístico de pruebas de estabilidad (hinchamientos)

General Linear Model: %H versus %Q; %C; Tiempo

Method

Factor coding (-1; 0; +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
%Q	Fixed	3	33; 50; 67
%C	Fixed	3	5; 9; 17
Tiempo	Fixed	6	1; 2; 3; 24; 48; 72

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
%Q	2	79355	39678	3.88	0.023
%C	2	416228	208114	20.36	0.000
Tiempo	5	879678	175936	17.22	0.000
Error	152	1553413	10220		
Lack-of-Fit	44	743723	16903	2.25	0.000
Pure Error	108	809690	7497		
Total	161	2928674			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
101.093	46.96%	43.82%	39.75%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	441.37	7.94	55.57	0.000	
%Q					
33	28.1	11.2	2.50	0.013	1.33
50	-2.1	11.2	-0.19	0.851	1.33
%C					
5	-6.3	11.2	-0.56	0.574	1.33
9	65.0	11.2	5.79	0.000	1.33
Tiempo					
1	-34.6	17.8	-1.95	0.053	1.67
2	-23.6	17.8	-1.33	0.186	1.67
3	42.0	17.8	2.36	0.019	1.67
24	130.2	17.8	7.33	0.000	1.67

Regression Equation

$$\%H = 441.37 + 28.1 \%Q_{33} - 2.1 \%Q_{50} - 26.0 \%Q_{67} - 6.3 \%C_5 + 65.0 \%C_9 - 58.7 \%C_{17} - 34.6 \text{Tiempo}_1 - 23.6 \text{Tiempo}_2 + 42.0 \text{Tiempo}_3 + 130.2 \text{Tiempo}_{24} - 4.1 \text{Tiempo}_{48} - 109.9 \text{Tiempo}_{72}$$

Fits and Diagnostics for Unusual Observations

Obs	%H	Fit	Resid	Std Resid	
37	703.0	445.8	257.2	2.63	R
52	587.3	370.5	216.8	2.21	R
109	893.9	428.5	465.4	4.75	R
137	870.8	563.2	307.6	3.14	R
160	67.7	299.1	-231.5	-2.36	R

R Large residual

Comparisons for %H

Tukey Pairwise Comparisons: Response = %H, Term = %Q

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

%Q	N	Mean	Grouping
33	54	469.471	A
50	54	439.262	A B
67	54	415.381	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Tukey Pairwise Comparisons: Response = %H, Term = %C

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

%C	N	Mean	Grouping
9	54	506.374	A
5	54	435.042	B
17	54	382.698	C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

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

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tiempo	N	Mean	Grouping
24	27	571.618	A
3	27	483.362	B
48	27	437.261	B
2	27	417.771	B
1	27	406.761	B C
72	27	331.455	C

Means that do not share a letter are significantly different.

6.3. Anexo C: Resultados pruebas de estabilidad (Hinchamientos)

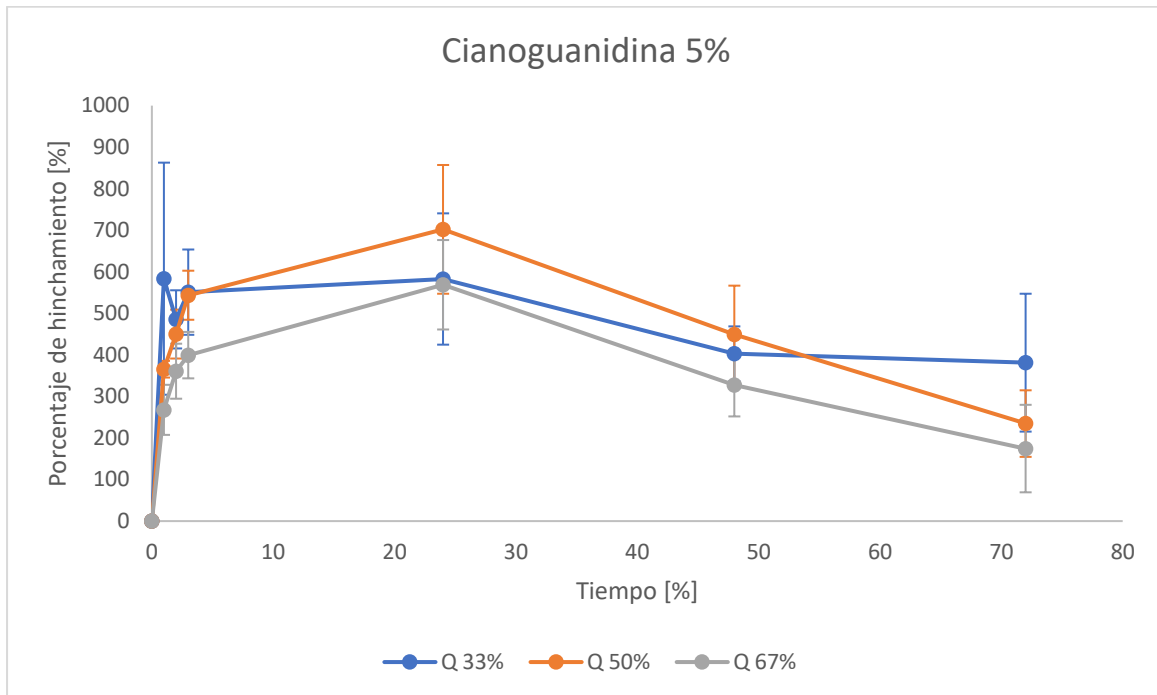


Figura 14. Hinchamientos para hidrogeles con 5% de Cianoguanidina y distintos porcentajes de quitosano

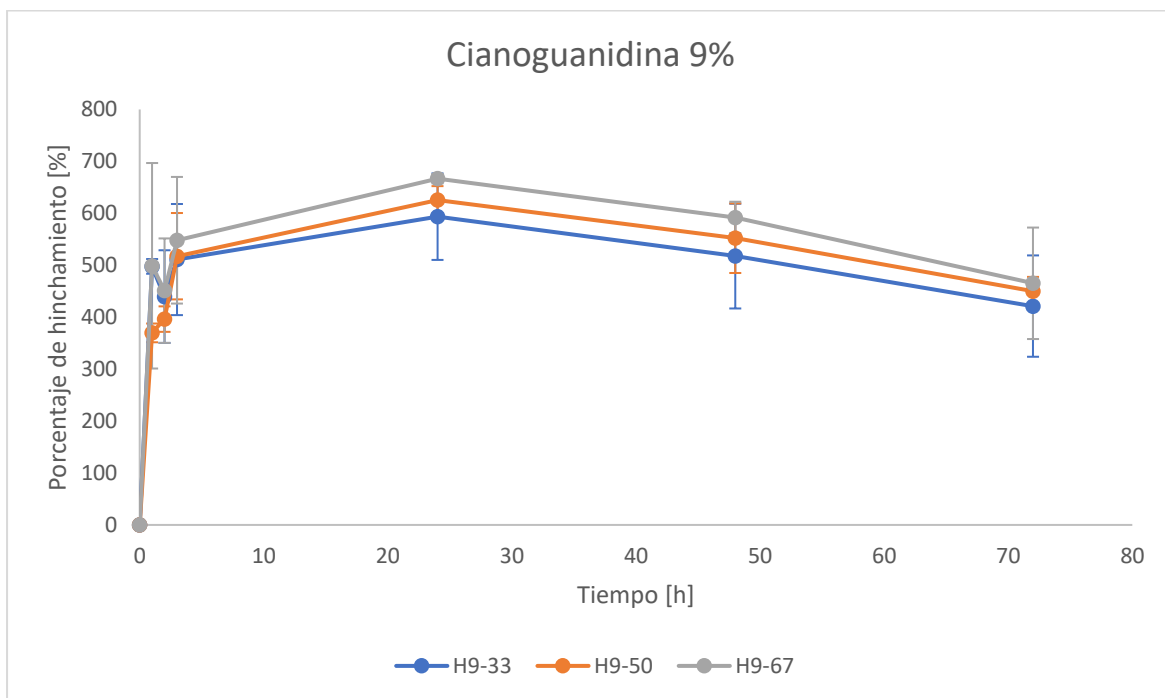


Figura 15. Hinchamientos para hidrogeles con 9% de Cianoguanidina y distintos porcentajes de quitosano

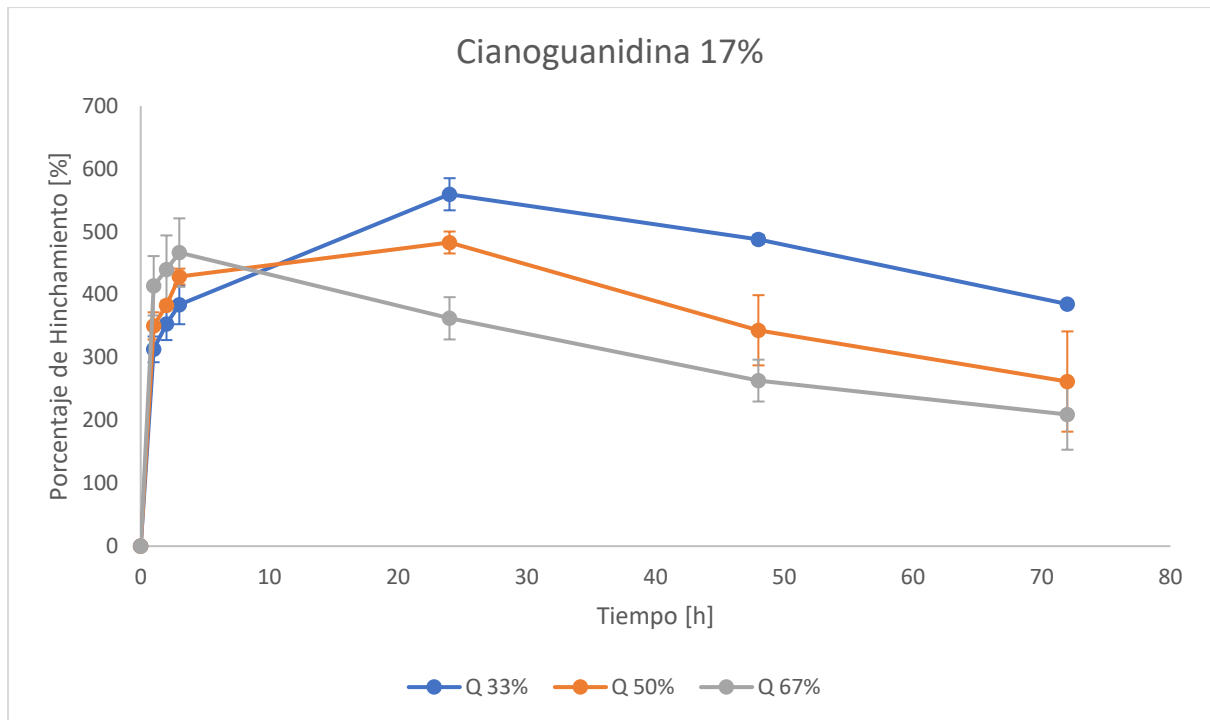


Figura 16. Hinchamientos para hidrogeles con 17% de Cianoguanidina y distintos porcentajes de quitosano