



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS MATERIALES

TESIS DOCTORAL

**“SÍNTESIS DE BIOPOLÍMEROS CON POTENCIAL APLICACIÓN EN
INGENIERÍA TISULAR”**

Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias de los Materiales

PRESENTA

M.C.M. Abner Hesli Rojas Calva.

Director(a):

Dra. María Aurora Veloz Rodríguez.

Co-Director(a):

Dra. Rosa Angeles Vázquez García.

Dr. José Angel Cobos Murcia.

Dra. Ana María Bolarín Miró.

Pachuca de Soto, Hgo., México, diciembre de 2022.



Mineral de la Reforma, Hgo., a 28 de noviembre de 2022

Número de control: ICBI-D/1618/2022
Asunto: Autorización de impresión.

MTRA. OJUKI ROCIO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

El Comité Tutorial de la tesis titulada "Síntesis de Biopolímeros con Potencial Aplicación en Ingeniería Tisular" realizado por el sustentante **Abner Hesli Rojas Calva** con número de cuenta **349489** perteneciente al programa de **Doctorado en Ciencias de los Materiales (tradicional)**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente.

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que el sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

El Comité Tutorial


Dra. María Aurora Veloz
Directora de tesis


Dra. Rosa Angeles Vázquez García
Codirectora


Dr. José Ángel Cobos Murcia
Titular


Dra. Ana María Bolarín Miró
Suplente


Dr. Otilio Arturo Acavedo Sandoval
Director del ICBI

04AS/80

Ciudad del Conocimiento
Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colinas
Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo
México, C.P. 42164
Teléfono: 771 71 720-00 ext. 2231 Fax: 2109
direccion_icbi@uaeh.edu.mx



UAEH 5000



www.uaeh.edu.mx

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
RESUMEN.....	8
I.- INTRODUCCIÓN.....	10
II.- ANTECEDENTES	12
2.1.- INGENIERIA TISULAR	12
2.2.- BIOGELES	23
2.3.- NANOFIBRAS.....	44
III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	48
IV.- JUSTIFICACIÓN.....	49
V.- HIPÓTESIS	50
VI.- OBJETIVOS.....	51
6.1.- OBJETIVO GENERAL.....	51
6.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
VII.- METODOLOGÍA.....	52
7.1.- OBTENCIÓN DE QUITOSANO Y QUITINA.....	54
7.2.- OBTENCIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO.....	62
7.3.- OBTENCIÓN DE QUITOSANO FUNCIONALIZADO	66
VIII.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
8.1.- CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO Y QUITINA	69
8.2.- CARACTERIZACIÓN DEL HIDROGEL	92
8.3.- CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO FUNCIONALIZADO	116
IX.- CONCLUSIONES	120
X.- PRODUCTOS	123
XI.- REFERENCIAS	124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Relación estructural entre la quitina y quitosano [13].	20
Figura 1.2. Esquema simplificado de obtención de quitosano a partir de conchas [13].	20
Figura 1.3. El hidrogel que se adhiere al peritoneo de un ratón [(a) Método A y (b) Método B]. El círculo blanco muestra el hidrogel formado [72].	36
Figura 1.4. Representación esquemática del proceso de gelificación basado en MAP vía cruzamiento no covalente mediado por coordinación Fe^{3+} -DOPA o DOPA [74].	38
Figura 1.5. Representación esquemática de la preparación y absorción de hidrogel compuesto de κ -carragenano-g-ácido acrílico-caolín / cloruro de nano-plata [65].	39
Figura 1.6. Estructura de redes poliméricas de doble red (DN): primera red azul (mayor entrecruzamiento), segunda red rojo (menor entrecruzada), hidrogel con propiedades mecánicas superiores [76].	41
Figura 1.7. La proteína zeína se puede reticular con fenólicos vegetales para imitar la química de adhesión de los mejillones marinos. A la izquierda: molécula de catecol y el maíz utilizado para extraer la proteína zeína. A la derecha: mejillones que se unen a una superficie de vidrio [77].	42
Figura 1.8. Diagrama de flujo del proceso de síntesis de quitosano.	53
Figura 1.9. Cáscara de camarón triturada.	55
Figura 1.10. Desproteínización de la cáscara de camarón mediante NaOH.	56
Figura 1.11. Desmineralización de la cáscara de camarón mediante HCl.	57
Figura 1.12. Despigmntación (a) pigmentación antes del proceso, (b) pigmentación después del proceso.	58
Figura 1.13. Muestra de productos del proceso de desacetilación con NaOH.	58
Figura 1.14. Partículas de quitosano en la solución neutralizada.	59
Figura 1.15. Cáscara de camarón en Ac. Acético 0.3 mol L^{-1} .	60
Figura 1.16. Arreglo electroquímico de desacetilación de quitina en medio HCl.	61
Figura 1.17. Mecanismo de Entrecruzamiento quitosano-glioxal.	63
Figura 1.18. Mecanismo de entrecruzamiento quitosano-glutaraldehído.	64
Figura 1.19. Mecanismo de funcionalización quitosano-metilglioxal.	67
Figura 1.20. Esquemización de los procesos de obtención de quitosano, Método Químico – Método Electroquímico.	71

Figura 1.21. Esquematización del Sistema electroquímico con un arreglo de 3 electrodos;	72
Figura 1.22. Voltamperograma cíclico de ácido acético 0.3 molL ⁻¹ a pH 4 sin especies hidrolizadas de camarón en una ventana de potencial de +4V a -4V, a 25mVs ⁻¹ durante 10 ciclos (a), Aumento de resolución en inicio de cada ciclo (b)	73
Figura 1.23. Diagrama de zonas de predominio del ion acetato 0.3 molL ⁻¹	74
Figura 1.24. Voltamperograma cíclico para ácido acético 0.3 molL ⁻¹ a pH 4 en sentido catódico de +4V a -4V, utilizando una velocidad de barrido 100mVs ⁻¹ durante 10 ciclos.74	74
Figura 1.25. Voltamperograma cíclico de ácido acético - cáscara de camarón a pH 4 en sentido anódico de +4V a -4V, velocidad de barrido 25mVs ⁻¹ , 10 ciclos.	76
Figura 1.26. Voltamperograma cíclico de ac. acético - cáscara de camarón a pH 4 sentido catódico de -4V a +4V, velocidad de barrido 100mVs ⁻¹ , 10 ciclos.	78
Figura 1.27. Voltamperograma cíclico de ácido acético - cáscara de camarón a pH 4; a) sentido catódico de OCP a -3V, b) sentido anódico de OCP a +3V ; velocidad de barrido 25mVs ⁻¹ , 10 ciclos.	79
Figura 1.28. Cronopotenciometría de ácido acético - cáscara de camarón en sentido catódico imponiendo una corriente de 1 A.	79
Figura 1.29. Representación de la reacción de desacetilación y su correlación con la evolución de H ⁺	80
<i>Figura 1.30. Microscopia óptica (10X) y MEB realizada a quitina obtenida por método químico a 100, 800, 2700 y 9,000 aumentos.</i>	<i>82</i>
<i>Figura 1.31. Microscopia óptica (10X) y MEB de estructura de quitosano obtenido por método químico a 50, 350, 400 y 4,000 aumentos.</i>	<i>83</i>
<i>Figura 1.32. Espectro Infrarrojo de las especies resultantes del proceso de síntesis de quitosano por método químico (Cáscara de camarón(azul) –quitina(rojo) – quitosano(negro)).</i>	<i>84</i>
<i>Figura 1.33. Espectro Infrarrojo realizado a los productos de la síntesis de quitosano por método de electrólisis forzada (Cáscara de camarón (negro) –quitina (rojo) –quitosano (azul)).</i>	<i>85</i>
<i>Figura 1.34. Espectro Infrarrojo de los productos obtenidos mediante el método de hidrólisis ácida.....</i>	<i>86</i>

Figura 1.35. Análisis comparativo de quitina –quitosano producto del método químico por DRX.....	88
Figura 1.36. Análisis comparativo de quitina –quitosano producto del método de electrólisis forzada por DRX.	89
Figura 1.37. Análisis comparativo de cáscara de camarón –quitosano producto del método de hidrólisis ácida por DRX.....	90
Figura 1.38. Analisis representativo de Huggins a 25°C en Ácido Acético para quitosano.	91
<i>Figura 1.39. Espectro Infrarrojo evaluando concentración de agente entrecruzante mediante entrecruzamiento químico de quitosano (negro), Q-GXL 20% (rojo), Q-GXL 30% (azul) y Q-GXL 40% (verde).</i>	93
<i>Figura 1.40. Espectro Infrarrojo evaluando concentración de agente entrecruzante mediante entrecruzamiento químico de quitosano (negro), Q-GTR 30% (rojo) y Q-GTR (azul).</i>	95
<i>Figura 1.41. Difractograma comparativo de productos del entrecruzamiento químico de Quitosano (negro), Quitosano – GXL 30% (rojo), Quitosano-GXL (azul) y Quitosano-GXL (verde).</i>	96
<i>Figura 1.42. Difractograma comparativo de productos del entrecruzamiento químico de Quitosano (negro), Quitosano – GTR 30% (rojo) y Quitosano-GTR (azul).</i>	97
<i>Figura 1.43. Absorción de agua de hidrogeles de Q-GXL al 20% (naranja), 30% (verde) y 40% (negro) en atmósferas con humedad relativa controlada.</i>	98
<i>Figura 1.44. Esfuerzo de ruptura de Q-GXL, al 20% y 30% de entrecruzante.</i>	99
<i>Figura 1.45. Cronoamperograma del sistema $Ti Q-Ac \text{ Acético} Ti-RuO_2$; $E=10V$.</i>	100
<i>Figura 1.46. Cronopotenciograma del sistema $Ti Q-Ac \text{ Acético} Ti-RuO_2$; $i=-500mA$ (rojo), $-550mA$ (azul), $-600mA$ (negro), $-650mA$ (amarillo) y $-700mA$ (verde).</i>	101
<i>Figura 1.47. Circuito equivalente para un sistema electroquímico sencillo [110].</i>	103
<i>Figura 1.48. Diagrama de Impedancia Nyquist del sistema $Ti Q-Ac \text{ Acético} Ti-RuO_2$..</i>	103
<i>Figura 1.49. Diagrama de Impedancia Bode del sistema $Ti Q-Ac \text{ Acético} Ti-RuO_2$</i>	104
<i>Figura 1.50. Circuito sencillo $[R(RC)]$ para el sistema $Ti Q-Ac \text{ Acético} Ti-RuO_2$</i>	105
<i>Figura 1.51. Circuito equivalente para la corrosión de un metal recubierto [110].</i>	106
<i>Figura 1.52. Diagrama de Impedancia Nyquist del sistema $Ti Q-GXL Ti-RuO_2$..</i>	106
<i>Figura 1.53. Diagrama de Impedancia Bode del sistema $Ti Q-GXL Ti-RuO_2$</i>	107

<i>Figura 1.54. Circuito para un polímero no conductor [R(RC WR)] para el sistema Ti Q-GXL Ti-RuO₂</i>	108
<i>Figura 1.55. Diagrama de Impedancia Nyquist del sistema Ti Q-GTR Ti-RuO₂</i>	108
<i>Figura 1.56. Diagrama de Impedancia Bode del sistema Ti Q-GTR Ti-RuO₂</i>	109
<i>Figura 1.57. Circuito para un polímero no conductor [R(RC WR)] para el sistema Ti Q-GTR Ti-RuO₂</i>	109
<i>Figura 1.58. Absorción de agua de hidrogeles de Q-GXL al 20% (amarillo), 30% (azul) y 40% (rojo) en atmósferas con humedad relativa controlada.</i>	111
<i>Figura 1.59. Absorción de agua de hidrogeles de Q-GTR al 20% (azul), 30% (naranja) y 40% (gris) en atmósferas con humedad relativa controlada.</i>	112
<i>Figura 1.60. Esfuerzo de ruptura de Q-GXL al 20% y de Q-GLT al 30% de entrecruzante.</i>	113
<i>Figura 1.61. Absorción de agua de hidrogeles de Q-GXL 40% (gris) en atmósferas con humedad relativa controlada.</i>	114
<i>Figura 1.62. Absorción de agua de hidrogeles de Q-GTR al 20% (azul), 30% (naranja) y 40% (gris) en atmósferas con humedad relativa controlada.</i>	115
<i>Figura 1.63. Esfuerzo de ruptura de Q-GXL al 40% de entrecruzante.</i>	116
<i>Figura 1.64. Espectro Infrarrojo de funcionalización electroquímica de quitosano (negro), Piruvaldehído (rojo) y Q –Py (azul).</i>	117
<i>Figura 1.65. Espectro Infrarrojo de funcionalización por mecanosíntesis de quitosano (negro), Piruvaldehído (rojo), Q –Py a 90 min (azul) y Q-Py a 180 min (verde).</i>	119

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Características básicas de un andamio para ingeniería tisular [29, 35, 38]	17
Tabla 1.2. Extracción de quitosano a partir de desechos de camarón.	21
Tabla 1.4. Esquema simplificado de obtención de quitosano a partir de conchas	31
Tabla 1.5. Resultados de análisis viscosimétrico a 25°C en Ácido Acético de quitosano	91
Tabla 1.6. Condiciones de reacción de la síntesis de hidrogeles de CS	92

RESUMEN

Un andamio en ingeniería tisular, es un material biocompatible capaz de generar una interacción con un sistema biológico donde en conjunto, puede suministrar un soporte a células y fármacos. Hoy en día los biopolímeros son materiales capaces de tener propiedades mecánicas aceptables sin sacrificar la biocompatibilidad. Esto ha fomentado sus aplicaciones como andamios celulares, que por su estructura tridimensional permiten un soporte inerte y un control de la absorción en el tejido u órgano. Investigaciones recientes se han centrado en el desarrollo de propiedades que van desde la capacidad de absorción y retención de líquidos, insolubilidad, adherencia, toxicidad nula, resistencia a la corrosión y capacidad de cambiar de volumen manteniendo su forma. Esto hace que las aplicaciones se potencien dentro del campo de la ingeniería tisular, la cual a pesar de ser considerada una rama de la ingeniería relativamente nueva, ha avanzado en los últimos años en aplicaciones como controladores de liberación de fármacos, dispositivos anticonceptivos, rellenos, adhesivos y regeneración de tejido óseo y dermis. En esto último se han encontrado excelentes resultados de funcionalidad, biomecánica y biocompatibilidad; generando el desarrollo de nuevos biomateriales con propiedades adecuadas para obtener sustitutos funcionales. Ello con el fin de ofrecer soluciones terapéuticas a pacientes con pérdida o falla de algún tipo de tejido; así como acelerar la curación de heridas mediante la aplicación de andamios proteínicos.

Entre los nuevos biomateriales se está explorando la aplicación de compuestos que tengan facilidad de producción o que se encuentren de forma abundante en la naturaleza. Tal es el caso del quitosano que puede ser extraído a partir de exoesqueletos de artrópodos. En este trabajo se propone la extracción del quitosano y la formación de un hidrogel mediante el entrecruzamiento químico y/o electroquímico de quitosano con compuestos dicarbonílicos. Además, la obtención de quitosano funcionalizado con metilglioxal busca mejorar las propiedades mecánicas, de adherencia, y biocompatibilidad. Estos nuevos biomateriales podrían ser empleados como andamios dentro del campo de la regeneración de tejidos. De igual manera se evaluará el efecto de factores tales como el grado de desacetilización del precursor, el método de síntesis, el tipo de agente químico, concentración y pH. Dichos factores son de suma importancia para concretar las propiedades del producto como andamio tisular.

ABSTRACT

A scaffold in tissue engineering is a biocompatible material qualified to generate an interaction with a biological system where, together, it can provide support to cells and drugs. Today biopolymers are materials capable of having acceptable mechanical properties without sacrificing biocompatibility. This has promoted their applications as cellular scaffolds, which due to their three-dimensional structure allow inert support and control of absorption in the tissue or organ. Recent research has focused on the development of properties ranging from the ability to absorb and retain liquids, insolubility, adherence, zero toxicity, corrosion resistance and the ability to change volume while maintaining its shape. This means that the applications are enhanced within the field of tissue engineering, which despite being considered a relatively new branch of engineering, has advanced in recent years in applications such as drug release controllers, contraceptive devices, fillers, adhesives and regeneration of bone tissue and dermis. In the latter, excellent results have been found in terms of functionality, biomechanics and biocompatibility; generating the development of new biomaterials with adequate properties to obtain functional substitutes. This last in order to offer therapeutic solutions to patients with loss or failure of some type of tissue; as well as accelerating wound healing through the application of protein scaffolds.

Among the new biomaterials, the application of compounds that are easy to produce or that are abundant in nature is being explored. Such is the case of chitosan that can be extracted from the exoskeletons of arthropods. In this work, the extraction of chitosan and the formation of a hydrogel through the chemical and/or electrochemical crosslinking of chitosan with dicarbonyl compounds is proposed. In addition, obtaining functionalized chitosan with methylglyoxal seeks to improve mechanical properties, adherence, and biocompatibility. These new biomaterials could be used as scaffolds in the field of tissue regeneration. In the same way, the effect of factors such as the degree of deacetylation of the precursor, the synthesis method, the type of chemical agent, concentration and pH will be evaluated. These factors are of utmost importance to specify the properties of the product as a tissue scaffold.

I.- INTRODUCCIÓN

Las células son los componentes fundamentales del tejido, y el tejido es la unidad básica de la función mecánica y estructural del cuerpo. Generalmente, grupos de células forman y secretan sus propias estructuras de soporte, llamada matriz extracelular [1, 2, 3]. Esta matriz, o andamio natural, hace más que sólo servir como soporte para las células; también actúa como una estación repetidora para varias moléculas de señalización. Por tal motivo, las células reciben mensajes de muchas fuentes y cada señal puede iniciar una cadena de respuestas que determina qué le sucede a la célula. Al entender cómo responden las células individuales a las señales, su interacción con su entorno y cómo se organizan en los tejidos, los investigadores han podido manipular estos procesos para sanar tejidos dañados. Hoy en día los biomateriales vienen a complementar dicha área científica interdisciplinaria que, para reparar, reemplazar, mantener o mejorar la función particular de un órgano o tejido, crea un entorno extracelular en el que se incorporan células de materiales biocompatibles que puedan soportarlas de manera inerte y, de igual manera hacer llegar íntegras las células a su locación final. Esto se logra mediante el uso de andamios o estructuras cuya función es proteger y generar una interacción funcional con la especie portadora [1, 2, 4, 5].

En este sentido, se ha estudiado experimental y/o clínicamente algunos materiales biocompatibles, biodegradables y bioreabsorbibles; que logran reunir características generales para el diseño de andamios; donde, idealmente, un andamio debe cumplir con las siguientes características: poseer geometría tridimensional, alta porosidad con una red de poros interconectados, biocompatibilidad, capacidad de reabsorberse, control de absorción, química superficial adecuada para la unión celular y propiedades mecánicas adecuadas para que coincidan con las de los tejidos en el sitio de la implantación [6, 7].

Esto ha logrado avances de suma importancia en la medicina moderna y contemporánea evitando en muchos casos la necesidad de reemplazo protésico e inserciones quirúrgicas riesgosas; recurriendo a la ingeniería de tejidos, mediante el desarrollo de sustitutos funcionales de tejido con tratamientos de células madre para formar un tejido de estructura, composición bioquímica y comportamiento funcional

igual al natural. Estas técnicas que van desde implementación de células madre, producen mejorías clínicas y funcionales [8], logrando una respuesta inmunológica favorable, con implantes compuestos de matriz extracelular de células madres y un ambiente adecuado para el desarrollo celular. Todo ello con el fin de ofrecer soluciones terapéuticas a pacientes con pérdida o falla de algún tipo de tejido, empleando biomateriales poliméricos hidrófilos como soporte, debido a sus excelentes propiedades mecánicas y similitud con el tejido biológico blando [9, 10].

Debido a la gran demanda y aceptación de las nuevas técnicas regenerativas, el análisis de biopolímeros empleados para fines de andamiaje celular y de fármacos, ha sido propuesto por otros autores [11, 12]. En este trabajo se busca llevar a cabo dos procesos para la elaboración de un biopolímero a base de quitosano, mediante una síntesis química y/o electroquímica, logrando favorecer propiedades como adherencia, solubilidad, flexibilidad así como una favorable resistencia a la tensión y compresión [13, 14, 15]. El quitosano es un biopolímero de gran interés y ampliamente estudiado en varios países debido a sus propiedades de biocompatibilidad, antibacterial y fortaleza estructural. Del primer proceso se busca obtener un hidrogel partiendo del entrecruzamiento mediante agentes químicos del tipo dicarbonílico, como el glicoxal y glutaraldehído que sirva como un reforzador a la cadena principal del quitosano formando una estructura reticulada capaz de alojar moléculas de agua entre ellas, sustentando propiedades como la liberación controlada de fármacos o proteínas [13, 14, 15]. En el segundo proceso se busca generar la funcionalización química y electroquímica de quitosano empleando como agente funcionalizante metilglicoxal (pyruvaldehído) comparando dos métodos mecanosíntesis y técnicas electroquímicas. Ambos procesos con el fin de generar biopolímeros con alta capacidad en aplicaciones como matriz extracelular sintética.

II.- ANTECEDENTES

2.1.- INGENIERIA TISULAR

El término ingeniería tisular (ingeniería de tejidos) es un término moderno, que fue adjudicado en 1987 a un campo interdisciplinario que involucra ciencias como la ingeniería, ciencia de los materiales, medicina y biología [3, 16], cuyo objetivo es la producción de substitutos viables que restauren, mantengan o mejoren las funciones de los tejidos y órganos humanos, mediante el desarrollo de implantes bioartificiales [16, 17, 18].

Aunque el título de ingeniería tisular fue otorgado en la primavera de 1987 por el Profesor Fung de la Universidad de California [19], los antecedentes documentales sobre el uso de materiales en procesos médicos de restauración de tejidos se remontan al uso de ciertos metales y otros productos naturales como madera en el antiguo Egipto así como civilizaciones griegas y romanas. En el siglo XVI se encontraron reparaciones dentales con oro y plata, así como inmovilizaciones de fracturas óseas con hierro, cuya predominancia era su propiedad inerte. A lo largo del siglo XIX se enfocaron en procesos que buscaron equiparar las propiedades mecánicas, sin que el material reaccionara biológicamente con el medio que lo rodea empleando aleaciones resistentes a la corrosión. Posteriormente, el desarrollo de los primeros polímeros en el siglo XX aceleró el proceso de elaboración de hilos para sutura degradables y absorbibles, adaptándose los materiales al medio biológico y no viceversa [2, 20].

Actualmente, el objetivo de esta disciplina consiste en lograr la interacción e integración del material, generando una respuesta celular apropiada que permita el crecimiento tisular sin afectar el transporte de nutrientes y factores de crecimiento en tiempos específicos biológicos.

De acuerdo a lo anterior, la problemática actual se basa en la correcta selección de los materiales aplicados dentro de la ingeniería tisular, acuñando un nuevo término que englobe una propiedad conocida como *biocompatibilidad*, que es la capacidad del material para existir dentro del cuerpo sin dañar las células adyacentes, y al mismo

tiempo, poseer la química de la superficie correcta para promover la unión y el funcionamiento de la célula [21, 22].

Los materiales que poseen dicha propiedad son catalogados como “*Biomateriales*” que según la definición son; “materiales sintéticos empleados para remplazar parte de un sistema vivo o que se encuentra en íntimo contacto con fluidos biológicos” [21, 23, 24].

Por ello, la ingeniería tisular, impulsada por los acelerados avances tecnológicos, gana un gran atractivo intrínseco para los científicos, los inversionistas y los medios. En el mercado a la alza, de finales de la década de 1990, la atención de los medios se volvió casi eufórica con los primeros avances. En 1999, el Dr. Michael Gillian, corresponsal de ciencia de *ABC*, informó en *Good Morning America* que los avances en ingeniería de tejidos y la medicina genética serían en un futuro próximo “*los mejores logros científicos del siglo XX*” [21]. Un año más tarde, la revista *Time* consideró la carrera en ingeniería de tejidos dentro de los “*10 mejores trabajos del futuro*” [25]. Ese mismo año, un informe en *Barron's* estimó que la medicina regenerativa estaba en camino a convertirse en una industria de cien mil millones de dólares [26].

Más recientemente en febrero de 2003, la revista *the Economist* informó, “estos son tiempos emocionantes para los ingenieros de tejidos. La tecnología para el crecimiento del cuerpo humano está avanzando rápidamente. Ya es posible cultivar sábanas de piel humana. Y enormes esfuerzos están en marcha para desarrollar estructuras aún más complejas, como válvulas cardíacas y órganos completos, como el hígado” [27]. Hoy en día y a pesar de una economía desfavorable, el campo de la ingeniería de tejidos sigue siendo altamente viable; con el número de empresas en el campo aumentando, debido a la dificultad que se ha encontrado al pasar de nivel de descubrimiento a los mercados clínicos y es consistente con las dificultades encontradas por otras tecnologías médicas innovadoras [28].

Toda la información precedente da una idea general de los avances que ha mostrado este tema de la medicina regenerativa en un tiempo relativamente corto, consolidando principalmente tres componentes clave para el desarrollo exitoso de tejido: 1) Células, 2) Andamios celulares y 3) Biomoléculas o inductores de crecimiento.

En este sentido la promesa de la ingeniería de tejidos *in-vitro* es combinar las células específicas para estimular la regeneración de un tejido particular, con un biomaterial que actúa como andamio (scaffold) dando soporte estructural a las células que dirigen el crecimiento del tejido, bajo condiciones apropiadas en las que interactúan la célula y la matriz [16, 29].

Debido a esto, la principal problemática que enfrenta la ingeniería de tejidos es la selección de un material con propiedades adecuadas para generar un andamio biológico, evaluando la macro y microestructura y no dejando de lado que, desde el punto de vista de la ingeniería de materiales, los tejidos se consideran compuestos celulares que representan sistemas multifases. En éstos, la arquitectura del andamio contribuye significativamente al desarrollo de funciones biológicas específicas en los tejidos, proporcionando las condiciones nutricionales apropiadas y la organización espacial para el crecimiento celular. Lo cual depende de la porosidad y tamaño de poro de la estructura tridimensional del soporte, ya que un área superficial grande favorece la unión de células y su crecimiento, mientras que se requiere un gran volumen de poro para acomodar y posteriormente entregar una masa de células suficiente para la reparación del tejido [19, 22, 28, 29].

Esto corrobora que el futuro de la ingeniería tisular se encuentra en manos de la innovación en generación de andamios biocompatibles, haciendo uso de procesos y materiales que proporcionen mejores propiedades y faciliten un control celular y de suministro de fármacos; estableciendo un papel decisivo no sólo de esta disciplina, sino de la medicina regenerativa.

2.1.1– CÉLULAS REGENERATIVAS

El cuerpo humano posee aproximadamente 100 trillones de células, con aproximadamente 260 diferentes fenotipos que se asocian en el espacio y en el tiempo para formar los tejidos y los órganos. Las células más próximas a una lesión pueden restaurar el daño por el denominado mecanismo de diferenciación. Se entiende por este último, la posibilidad que tiene una célula de diferenciarse, perder sus características originales y con adquirir propiedades nuevas. Por otra parte, las células que participan en la construcción de un nuevo tejido, deben tener capacidad

reproductiva; esto es, células en ciclo celular que no hayan entrado todavía en el proceso de diferenciación terminal. Se trata por lo tanto de células madre capaces de dar origen a células hijas más diferenciadas [16, 17].

Los requerimientos esenciales en la ingeniería de tejidos son una fuente de células apropiadas. El uso oportuno de células específicas es, por lo tanto, uno de los factores que definen el éxito de la ingeniería de tejidos. En los últimos años, se ha prestado considerable atención a la adecuada identificación de las fuentes correctas de células que proporcionen las funciones específicas de tejidos y/u órganos. Aunque las células especializadas siguen siendo una fuente importante para la ingeniería de tejidos, hoy en día el uso de células madre se ha reconocido recientemente como una alternativa prometedora para las células especializadas debido a su enorme potencial en la generación de un amplio espectro de tejidos con funciones adecuadas [29, 30, 31].

Las células madre, por definición, “son células inmaduras o indiferenciadas que pueden renovarse por sí mismas y dividirse en células más especializadas, de tejido u órgano específico” [32, 33]. Esta habilidad les permite actuar como un buen sistema de reparación para los tejidos u órganos defectuosos de nuestro cuerpo. Las células madre generalmente se clasifican en tres tipos: totipotentes, se consideran las células del embrión en sus primeros días, y dan lugar a un nuevo individuo (cigotos); pluripotentes, son de origen embrionario y pueden dar origen a ectodermo, mesodermo y células germinales y así mismo dan origen a más células madre pluripotentes (ejemplo, células madre embrionarias); y, por último, multipotentes, atribuido a células adultas con mayores diferencias entre sí y limitadas a crear un tipo de células específicas (ejemplo, células madre mesenquimáticas) [29, 33, 34]

Las células madre también se clasifican en células embrionarias o adultas según su fuente de origen;

Las células madre embrionarias, como su nombre lo indica, se derivan de la etapa inicial de un embrión que se encuentran en el macizo celular interno del blastocisto, del cual se pueden obtener por disección mecánica o inmunológica. Tienen dos propiedades importantes:

Pueden proliferar en un estado indiferenciado, reproduciéndose a sí mismas en cultivo, en forma ilimitada (inmortales) y pueden diferenciarse. Son pluripotenciales, es decir, pueden originar células que se diferenciarán a cualquiera de las tres capas embrionarias: endo, ecto y mesodermo [29, 31].

Por el contrario, las células madre adultas tienen un gran interés clínico. Se encuentran en diferentes cantidades en casi todos los tejidos con capacidad de regenerarse, especialmente, en la médula ósea, tejido graso y tejido conjuntivo. Son multipotenciales, o sea son capaces de dar origen a células especializadas de su misma línea embrionaria. Básicamente, éstas son células indiferenciadas que se encuentran entre las células diferenciadas en un tejido u órgano. La ventaja potencial de usar células madre adultas es que las propias células del paciente podrían aislarse fácilmente, expandirse en cultivos y luego trasplantarse en el cuerpo del paciente donde se requiere la regeneración tisular. Por este enfoque, hay mínima posibilidad de rechazo inmune, y pocos problemas éticos y legales [29, 31].

El tratamiento con células madre ha dado lugar a un nuevo tipo de tratamiento que se puede catalogar como terapia celular regenerativa y que en la actualidad es uno de los temas más excitantes y de reconocido valor en la medicina contemporánea. Y por supuesto pueden tener proyección en aplicaciones biotecnológicas. En suministro de fármacos, hace unos años esto podía parecer ciencia ficción, sin embargo, hoy en día, ya existen resultados que avalan una realidad muy próxima [35, 36].

2.1.2- ANDAMIOS CELULARES

En la ingeniería tisular, la generación de tejidos artificiales de naturaleza mesenquimal como el hueso, el cartílago, la dermis o la lámina propia de la mucosa oral requiere algún tipo de material que actúe como sustituto de la matriz extracelular del tejido nativo. Para ello se utilizan varios tipos de biomateriales. Así, el término biomaterial designa a aquellos materiales utilizados en la fabricación de sistemas biológicos. Entre las características de estos materiales se encuentra la de ser biocompatibles o biológicamente aceptables. De este modo, en la evaluación de un material, resulta fundamental examinar su biocompatibilidad y capacidad de reabsorción, ya que permanecen en contacto con los tejidos vivos. Por ello resulta imprescindible que no

se produzcan reacciones no deseadas en la interfase tejido-material y que mantenga sus propiedades durante el tiempo que tenga que desempeñar su función.

En la Ingeniería Tisular, los biomateriales deben favorecer la función biológica y mecánica de las células ya que actúan como una matriz extracelular artificial y bajo dicha función se denominan andamios (scaffolds), que son una estructura de soporte temporal para el crecimiento de células y tejidos. También se llama matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) sintética y juega un papel fundamental en el apoyo de las células para adaptarse, proporcionando un sustrato de adhesión que ofrece a las células sitios específicos en el cuerpo con una eficiencia de carga. Adicionalmente, pueden proporcionar propiedades mecánicas que sirven de apoyo en contra de las fuerzas sujetas en una estructura tridimensional. También, las señales bioactivas, como los péptidos de adhesión celular y factores de crecimiento, se pueden integrar junto con las células para ayudar a regular la función de las mismas; esto para que las células soportadas experimenten proliferación, migración y diferenciación en tres dimensiones; lo que finalmente conduce a la formación de un tejido específico con las funciones apropiadas que se encontrarían en el cuerpo humano [16, 29, 37].

Para facilitar estas medidas, el andamio debe poseer algunas características básicas, que son deseables para la mayoría de las aplicaciones de ingeniería de tejidos y que se ven descritas en la tabla 1.1.

Tabla 1.1. Características básicas de un andamio para ingeniería tisular [29, 35, 38]

Características	Descripción General
Biocompatibilidad	Biológicamente compatible con el tejido del huésped (es decir, no debe provocar ningún rechazo, inflamación ni respuesta inmunitaria)
Biodegradable	La tasa de degradación debe coincidir perfectamente con la tasa de regeneración tisular, y los productos degradados no deben dañar los tejidos vivos.
Soporte vascular	Debe proporcionar canales para el suministro de sangre para la regeneración de tejido rápida y saludable

No tóxico	No debe evocar toxicidad a los tejidos
No inmunogénico	No debería provocar una respuesta inmunogénica a los tejidos
No corrosivo	No debe corroerse a pH fisiológico y a la temperatura corporal
Porosidad con poros interconectados	Maximizar el espacio para la adhesión celular, el crecimiento, la secreción de matriz extracelular, la revascularización, la nutrición adecuada y el suministro de oxígeno sin comprometer la resistencia mecánica, esto tanto para células exógenas o endógenas tanto en cultivo <i>in vitro</i> como en implantaciones <i>in vivo</i>
Estructura 3D	Para ayudar al crecimiento interno celular y el transporte de nutrientes y oxígeno
Alta relación área de superficie a volumen	Para acomodar celdas de alta densidad
Superficie modificable	Para funcionalizar grupos químicos o biomoleculares para mejorar la adhesión celular
Resistencia mecánica adecuada	Proporcionar estabilidad mecánica y de formar defectos. Para resistir los estímulos <i>in vivo</i>
Esterilizable	Para evitar la contaminación tóxica

Es importante entender que un andamio ideal para la regeneración de tejidos debe poseer todas las cualidades de una ECM nativa y debe funcionar de la misma manera bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, no hay una guía clara en cuanto a qué característica define el llamado andamio ideal. La ECM nativa en el cuerpo es un entorno complejo y dinámico lleno de nano-características de poros y fibras que dan origen a estructuras y propiedades específicas del tejido. Por lo tanto, las características de un andamio varían según los tipos de tejido donde se debe aplicar el andamio.

Actualmente los estudios se enfocan en conocer las interacciones específicas entre propiedades físico-químicas, química de superficie, propiedades mecánicas, absorción isotérmica de ciertas proteínas y comportamientos celulares; así como la adhesión, activación, liberación de citoquinas y factores de crecimiento.

Todo esto presenta nuevos retos en cuanto a diseño y fabricación de estos andamios mediante biomateriales poliméricos que cumplen con estas condiciones. Materiales

aplicados como matrices de nanofibras, microesferas o hidrogeles obtenidos de polímeros biodegradables y biocompatibles, contienen moduladores celulares y moleculares que estimulan la cicatrización de heridas. Debido a su estructura porosa y su buena resistencia mecánica, proporcionan un microambiente óptimo para la proliferación, migración y diferenciación celular [39].

2.1.3– QUITINA Y QUITOSANO

El quitosano es el principal derivado de la quitina (producto parcialmente desacetilado); ésta se encuentra principalmente en las conchas de los crustáceos y formando parte del exoesqueleto (caparazones) de los insectos, alas (cucarachas y escarabajos); así como también en las paredes celulares de muchos hongos, levaduras y algas [13, 40].

Es el segundo polisacárido lineal más abundante y un polielectrolito catiónico presente en la naturaleza, conformado por unidades de β -(1,4)-2-desoxi-2-amino-D-glucopiranososa (D-glucosamina) y β -(1,4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranososa (N-acetil-D-glucosamina), presenta una configuración helicoidal tridimensional estabilizada mediante enlaces de hidrógeno [9, 41, 42]. El descubrimiento del quitosano se le atribuye a Rouget en 1859, quien encontró que calentando la quitina en medio alcalino se volvía soluble en ácidos orgánicos. En 1894 Hoope-Seyler llama a este material quitosano y solo hasta 1950 se logra dilucidar su estructura química [41, 43](figura 1.1).

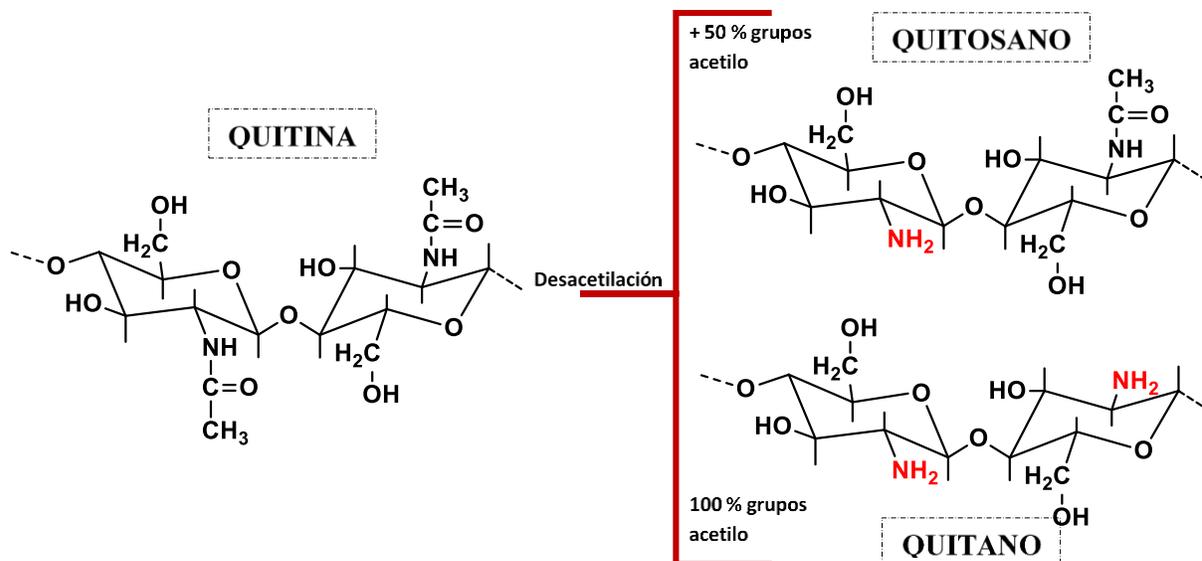


Figura 1.1. Relación estructural entre la quitina y quitosano [13].

Desde el punto de vista químico, los procesos de obtención de quitosano partiendo de quitina son sumamente atractivos y sencillos como se visualiza en la figura 1.2. Esto debido a sus versátiles actividades biológicas y aplicaciones químicas.

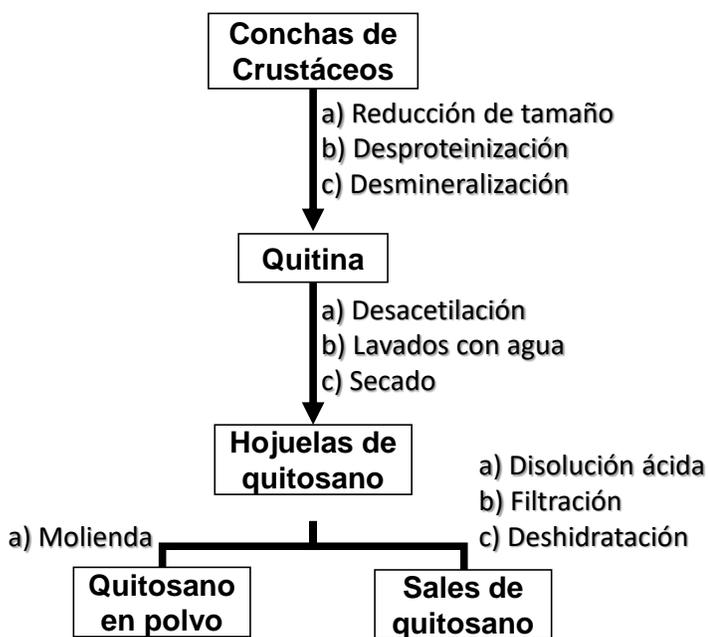


Figura 1.2. Esquema simplificado de obtención de quitosano a partir de conchas [13].

Los desechos del caparazón de los crustáceos están compuestos por proteínas (20-40%), sales de calcio y magnesio, mayormente carbonato y fosfato (30-60%), quitina

(20-30%) y lípidos (0-14%), variando estas proporciones con la especie y la estación. Por lo tanto, el aislamiento de la quitina de los biodesechos de crustáceos, implica 3 operaciones básicas [44, 45]:

- a) Desproteínización: Separación de la proteína.
- b) Desmineralización: Eliminación de la materia orgánica.
- c) Decoloración: Separación de los pigmentos lipídicos (carotenoides).

Con la quitina extraída se procede a la obtención del quitosano por un proceso de desacetilación que puede ser mediante múltiples técnicas descritas brevemente a continuación (tabla 2):

Tabla 1.2. Extracción de quitosano a partir de desechos de camarón.

AUTOR	TÉCNICA EMPLEADA	OBSERVACIONES DEL PROCESO
Nemtsev 2002 [46]	Desacetilación química homogénea	Temperatura Ambiente Tiempos prolongados Productos con uniformidad en desacetilación y peso molecular.
Synowiecki 2003 [47]	Desacetilación química heterogénea	Temperatura y Presiones elevadas Tiempos relativamente cortos La desacetilación favorece faces amorfas obteniendo pesos moleculares variables
Pandey 2003 [48]	Fermentación en medio sólido	Uso de Microorganismos Medio seco (sin agua libre) Es necesario un sustrato orgánico alto en proteínas y un control en el metabolismo y excreción, así como un proceso de Purificación Tiempos Prologados.

Young-ju 2008 [49]	Desacetilación biológica	Enzimas termoestables (h e i) Catalizan la reacción mediante hidrólisis de los residuos de acetilglucosamina Es necesaria una purificación de productos
-----------------------	-----------------------------	--

Estos inconvenientes dentro de los procesos descritos han estimulado el desarrollo de procesos que reduzcan o eliminen el uso y generación de sustancias peligrosas, asociados a bajos rendimientos. Los procesos propuestos que permiten eliminar proteínas y/o sales de los residuos de crustáceos, incluso que puedan ser reutilizados en la producción de alimentos animales y pigmentos, son de gran atractivo.

La importancia de dichos procesos radica en las propiedades como un compuesto biodegradable y biocompatible, posee similitud estructural con glucosaminoglicanos naturales y degradación por enzimas como la quitosanasas y la lisozima, características que unidas a su naturaleza policatiónica, han estimulado su empleo en diversas aplicaciones biomédicas [50]. La capacidad del quitosano de formar películas o soportes ha encontrado numerosas aplicaciones, dentro de los campos de ingeniería de tejidos y liberación de fármacos, gracias a su versatilidad como a su baja tasa de biodegradación [41, 51].

Los soportes de quitosano pueden servir para mantener, reforzar y en algunos casos organizar la regeneración tisular; como matriz puede ser utilizada para liberar materiales bioactivos o influenciar directamente el crecimiento celular. En muchas aplicaciones que involucran cultivo celular se requiere la incorporación de matrices poliméricas biodegradables, las cuales deben contar con una microestructura porosa y compatibilidad con las células en crecimiento. Al igual que la quitina, el quitosano es degradado por la lisozima, una enzima proteolítica no específica presente en todos los tejidos del cuerpo humano. El quitosano, por presentar en la cadena polimérica grupos amino libres, los cuales se protonan en medio ácido, es soluble en la mayoría de los ácidos orgánicos acuosos como el ácido acético, fórmico, entre otros [40, 43]. Por lo tanto, se ha informado que muchos derivados mejoran la solubilidad y la procesabilidad de este polímero.

Debido a los frecuentes usos de este biocompuesto y el cúmulo de aplicaciones emergentes que se desarrollan hoy en día; la necesidad de tecnologías de extracción con un mayor grado de rentabilidad, así como la optimización del rendimiento del proceso ha impulsado la búsqueda de adecuaciones de procesos novedosos. Tales como las electrosíntesis orgánicas donde se involucran técnicas como electrodeposición química para generar el crecimiento de una especie, con la ventaja de ser técnicas económicas y que a su vez presenta diversas ventajas entre las que se puede resaltar: amplia disponibilidad de precursores que permiten controlar el pH y concentración del electrolito fácilmente, el control de espesores en las películas, uniformidad, razón de depósito y procesos isotérmicos; así como, la electrólisis en soluciones ácidas. Esto debido a que en pH bajos las aminas se protonan y se cargan positivamente, haciendo al quitosano un polielectrolito catiónico soluble. Dichos procesos exhiben una geometría y morfología definida con desacetilación uniforme. [52, 53, 54].

2.2.- BIOGELES

Un gel es una sustancia con estructura reticulada (red entrecruzada) flexible que puede absorber disolventes, pero que es insoluble en él y cuyo peso molecular se puede considerar infinito. Dicha absorción de disolvente corresponde a fuerzas de capilaridad, ósmosis e interacciones moleculares polímero-disolvente entre otras, y son lo suficientemente fuertes como para ejercer una influencia considerable en la estructura del gel [55].

Algunos geles tienen la propiedad de experimentar transiciones de fase que se traducen en cambios de volumen (transiciones de hasta 1000 veces el tamaño del gel seco) al sumergir en determinados disolventes en ciertas condiciones, dichos cambios de volumen son provocados por pequeños cambios en variables externas, tales como temperatura, fuerza iónica, pH, composición del disolvente entre otras [56].

Existen dos tipos de geles de acuerdo al carácter del disolvente; si el líquido que solvata las cadenas es orgánico recibe el nombre de *organogel*, mientras que si el responsable de la solvatación es el agua, entonces se denominan *hidrogeles* [55, 56].

2.2.1.- CARACTERÍSTICAS, PROPIEDADES Y USOS DE LOS HIDROGELES

Los hidrogeles son polímeros que poseen características particulares. Como ser hidrófilos, insolubles en el agua, blandos, elásticos, que en presencia de agua se hinchan, aumentando considerablemente su volumen. Pueden absorber de 10 a 20% (un límite inferior arbitrario) hasta miles de veces su peso seco en agua, pero manteniendo su forma hasta alcanzar un equilibrio físicoquímico. Son sistemas en estado coloidal con apariencia sólida [57, 58]. La hidrofilia de estos geles es debido a grupos como: $-NH_2$ (amino), $-OH$ (hidroxilo), $-COOH$ (carboxilo), $-CONH_2$ (amida), y $-SO_3H$ (ácido sulfónico) [55, 59, 60, 61]. Su insolubilidad en agua es originada por la existencia de una red tridimensional en su estructura polimérica.

El entrecruzamiento puede ser debido a la existencia de fuerzas cohesivas débiles (como fuerzas de Van Der Waals y enlaces de hidrógeno) y a enlaces covalentes o iónicos. Son de tacto suave y su consistencia elástica se ve determinada por el monómero hidrófilo de partida y su baja densidad de entrecruzamiento. El estado de equilibrio del hidrogel hinchado es resultado del balance entre las fuerzas osmóticas originadas por el agua al entrar en la red macromolecular y las fuerzas cohesivas ejercidas por estas cadenas que se oponen a esa expansión [55, 56, 60]. Por lo cual el proceso de preparación del hidrogel es crucial para determinar la capacidad de hinchamiento que este tendrá, debido a que los espacios que se establecen entre las redes poliméricas flexibles que se forman en el proceso determinarán la cantidad de agua que el hidrogel pueda albergar. Dicha flexibilidad a su vez es función del peso molecular, el grado de pureza del polímero y de su concentración en solución acuosa; además de factores propios del método físico o químico de síntesis [59].

Los hidrogeles pueden ser químicamente estables o pueden degradarse y eventualmente desintegrarse y disolverse. Se denominan geles "reversibles" o "físicos" cuando las redes se mantienen unidas por entrelazamientos moleculares y/o fuerzas secundarias, incluidas las fuerzas iónicas, enlaces H o fuerzas hidrofóbicas. Los hidrogeles físicos no son homogéneos, ya que los grupos de encruzantes moleculares, o dominios asociados hidrofóbicamente o iónicamente, pueden crear

inhomogeneidades. Los extremos de cadena libre o los bucles de cadena también representan defectos de red transitorios en geles físicos [62].

Los hidrogeles se llaman geles "permanentes" o "químicos" cuando son redes reticuladas covalentemente. También se pueden generar hidrogeles químicos por reticulación de polímeros solubles en agua o por conversión de polímeros hidrófobos (repelen el agua) en polímeros hidrófilos (absorbe agua con facilidad) más reticulación para formar una red [62].

Los hidrogeles pueden tener muchas formas físicas diferentes, que incluyen; (a) formas moldeadas sólidas (Lentes de contacto blandos), (b) matrices de polvo prensado (cápsulas para ingestión oral), (c) micropartículas (bioadhesivos portadores o tratamientos de heridas), (d) revestimientos (por ejemplo en implantes o catéteres, en cápsulas, o revestimientos en la pared capilar interna en electroforesis capilar), (e) membranas o láminas (como depósitos en parche transdérmico de suministro de fármaco, o para geles de electroforesis en 2D), (f) sólidos encapsulados (bombas osmóticas) y (g) líquidos (que forman geles al calentar o enfriar) [61, 62].

2.2.2.- OBTENCIÓN DE HIDROGELES

A lo largo de la incursión a estos nuevos materiales se han empleado diversas técnicas para sintetizar hidrogeles, principalmente se obtienen mediante polimerización y entrecruzamiento simultáneo de uno o varios monómeros mono o polifuncionales, donde las características de los grupos funcionales que forman estos monómeros y el grado de entrecruzamiento, determinan las propiedades de hinchamiento del xerogel (hidrogel seco) y por tanto su aplicación [61].

En función a la naturaleza de la unión de la red tridimensional que logra constituir el gel se pueden clasificar en geles físicos y químicos:

Los geles físicos se forman por uniones que no son completamente estables (se modifican por factores como temperatura, pH entre otros cambios físicos), generalmente estas uniones son del tipo de Van Der Waals y puente de hidrógeno. Se suelen obtener mediante calentamiento de una solución de polímero, enfriando una solución de polímero, entrecruzamiento (un polímero en solución acuosa); ciclos de

congelación-descongelación para formar microcristales de polímero, empleando un bajo pH para formar un gel unido a H⁺ entre dos polímeros diferentes en la misma solución acuosa; mezclas de soluciones de un polianión y un policatió para formar un gel conglomerado complejo; o empleando una solución de polielectrolito con un ion multivalente de carga opuesta.

En los geles químicos, a diferencia de los físicos, sus redes se unen por medio de enlaces covalentes que dan como resultado una unión más fuerte. Estos se obtienen mediante polímeros reticulados en estado sólido o en solución empleando: radiación, reticulantes químicos, compuestos reactivos multifuncionales, copolimerización con un monómero y un reticulante en solución, copolimerizar un monómero con un macrómero multifuncional, polimerizando un monómero dentro de un polímero sólido diferente para formar un gel o convertir químicamente un polímero hidrófobo en un hidrogel [62].

Aunque cada uno de estos métodos de gelificación tiene sus ventajas y limitaciones, el campo ha estado avanzando hacia la combinación de múltiples componentes y/o mecanismos para lograr formulaciones mejoradas de hidrogel. La generación de *compósitos* mediante la adición de componentes como: nanocompuestos de arcillas (mecánica mejorada del hidrogel) [63], nanotubos de carbono (propiedades térmicas, mecánicas y eléctricas mejoradas) [64], grafeno u óxido de grafeno (excelentes propiedades ópticas, eléctricas y mecánicas), nanopartículas metálicas (propiedades antimicrobianas, conductividad eléctrica) [65] y nanopartículas semiconductoras (propiedades fotoquímicas, fotocatalíticas y de fluorescencia) [66].

2.2.3.- APLICACIONES DE LOS HIDROGELES

Los hidrogeles exhiben excelentes propiedades fisicoquímicas, tales como una mecánica sustancialmente mejorada, inyectabilidad, autocuración y la posibilidad de someterse a modulación dinámica [58] y, son materiales muy apropiados para aplicaciones en medicina dada su buena interacción con los tejidos vivos, ya que, por un lado muestran buenas propiedades de biocompatibilidad, debido principalmente a su consistencia blanda, elástica y contenido de agua. Por otro lado, son materiales inertes por lo que las células y proteínas no tienden a adherirse a su superficie,

asimismo, su característica de hinchamiento en medio líquido les aporta la propiedad de absorber, retener y liberar bajo condiciones controladas, algunas soluciones orgánicas [59].

Debido a sus excelentes propiedades, tienen una gran importancia tecnológica y económica con un extenso campo de aplicaciones: utilizado en lentes de contacto, materiales absorbentes (pañales), prótesis de tejidos, revestimientos de suturas, membranas de hemodiálisis, soportes para catalizadores, depósitos de agua y nutrientes para plantas y cultivos [57].

Aunque los hidrogeles tienen muchas propiedades ventajosas, también se asocian varias limitaciones con estos materiales. Tienen una resistencia a la tracción deficiente que podría limitar su uso en aplicaciones de carga de fármacos y puede dar como resultado la disolución prematura o derrame del hidrogel dentro de los tejidos y órganos específicos. Este inconveniente es de suma importancia en muchas tecnologías de administración de fármacos tópicos y subcutáneos. La cantidad y la homogeneidad de los fármacos hidrofóbicos también se minimizan en hidrogeles. Otra desventaja es la presencia de una gran cantidad de agua y tamaños de poro grandes en la mayoría de los hidrogeles que a menudo dan como resultado una liberación de fármaco relativamente rápida, en pocas horas.

La aplicación de hidrogel también puede ser problemática a veces; aunque algunos hidrogeles son ultradeformables para ser inyectados, muchos no lo son; por lo tanto, necesitan inserción quirúrgica. La innovación en hidrogel también está relacionada con problemas tales como solubilidad, alta cristalinidad, no biodegradabilidad, propiedades mecánicas y térmicas desfavorables, monómeros sin reaccionar y el uso de reticuladores tóxicos. Por lo tanto, la mejora de estas propiedades puede ser posible con el uso de una combinación de polímeros naturales y sintéticos con propiedades mejoradas [60].

Los hidrogeles en la ingeniería de tejidos deben cumplir con un número de criterios de diseño para funcionar apropiadamente y promover la formación de nuevos tejidos. Estos criterios incluyen parámetros físicos clásicos (degradación y mecánica) así como

parámetros de rendimiento biológico (adhesión celular). Un parámetro absolutamente crítico es la biocompatibilidad de los hidrogeles que se relaciona con la capacidad del material para existir dentro del cuerpo sin dañar las células adyacentes o causar cicatrices significativas o de lo contrario provocar una respuesta que le quita su función deseada [21]. Los polímeros derivados naturalmente frecuentemente demuestran una biocompatibilidad adecuada, mientras que los polímeros sintéticos pueden provocar respuestas negativas significativas del cuerpo. El mecanismo de gelificación, y el comportamiento de transición de fase inherente, son de suma importancia para definir estas propiedades. La reticulación iónica con contraiones multivalentes es una forma simple de formar hidrogeles.

Sin embargo, esos iones podrían intercambiarse con otras moléculas iónicas en ambientes acuosos, lo que daría como resultado un deterioro incontrolado de las propiedades originales de los hidrogeles. El entrecruzamiento covalente es un método para controlar con precisión la densidad de reticulación de los hidrogeles. Sin embargo, debe considerarse la toxicidad de las moléculas de reticulación, y la formación de enlaces cruzados no degradables puede ser desventajosa en la mayoría de las aplicaciones de ingeniería de tejidos. Un enfoque reciente es la utilización del comportamiento de transición de fase de ciertos polímeros. Por ejemplo, un cambio muy pequeño de temperatura cerca de la temperatura de solución crítica más baja (LCST) puede desencadenar la transición de fase de una solución de polímero a un gel (diseñar la LCSF para que esté cerca de la temperatura corporal) [67].

En el caso de los hidrogeles sintéticos, son considerados frágiles debido a la ausencia de disipación de energía mecánica en la zona de proceso, es decir, un valor notablemente bajo de la energía de fractura intrínseca. Este problema se intensifica cuando se presentan heterogeneidades dentro de la red de polímeros que surgen durante el proceso de gelificación. Debido a la falta de homogeneidad en la densidad de reticulación o en los puntos reticulados de la cadena, o la presencia de cadenas y bucles colgantes, el valor de la energía de fractura puede disminuir aún más, esto es comparable al comportamiento de fallo de cualquier material; los defectos microestructurales siempre juegan un papel como concentrador de esfuerzos, lo que

lleva a una falla prematura del material. Esta es la razón por la cual la resistencia a la fractura real de un material es típicamente mucho más baja que los valores teóricos calculados [66].

En conclusión, las propiedades mecánicas de los hidrogeles dependen principalmente de la rigidez original de las cadenas de polímeros, los tipos de moléculas de entrecruzamiento y la densidad de entrecruzamiento, e hinchazón como resultado del equilibrio hidrófilo / hidrofóbico [67]. Debido a todo esto se han creado tres consideraciones en el mecanismo para sintetizar hidrogeles duros:

- (i) Deshacerse de todo tipo de heterogeneidades en la red de polímeros.

La razón principal de dicha heterogeneidad es la diferencia en la velocidad de reacción de los monómeros y los reticulantes; la reactividad de los reticuladores es típicamente más alta debido a sus múltiples funcionalidades, esto se presenta mediante la formación de microgeles debido a la rápida acción del reticulante que después se unen formando el gel. También se encontró que las cadenas de polímero entre las esferas de microgel estaban más enredadas cuando la concentración inicial de los monómeros era alta.

- (ii) Introducción de un mecanismo que disipa la energía de fractura durante la propagación de grietas.

Cuando una grieta avanza, se libera energía y se transporta a la punta de la grieta; Si esta energía es suficiente para romper los enlaces químicos en la punta de la grieta, la grieta se propagará. Los hidrogeles se pueden reforzar mediante sobre posición de cadenas de doble red o con fibra/relleno [68].

- (iii) La tercera categoría de hidrogeles resistentes es incorporar ambos mecanismos, es decir, la distribución uniforme de esfuerzos y la disipación de energía mecánica.

Los hidrogeles adhesivos requieren tanto propiedad adhesiva en la superficie como unión cohesiva dentro de la porción en masa del hidrogel adhesivo. Cuando la adhesión y la cohesión son equilibradas, los hidrogeles adhesivos exhiben la

funcionalidad óptima. Debido a que los hidrogeles adherentes tienen alto contenido de agua, una adhesión controlada del tejido, buena biocompatibilidad y resistencia mecánica sintonizable, ha habido un gran interés en las aplicaciones como selladores quirúrgicos y pegamentos, matrices de integración tisular, parches de administración de fármacos, entre otros.

Generalmente estos hidrogeles se clasifican en polisacáridos, adhesivos sintéticos y basados en proteínas

a) Hidrogeles Polisacáridos

El quitosano es un polisacárido lineal más empleado en el cual el mecanismo de adhesión se atribuye a muchas posibles fuentes, como atracción iónica, enlace covalente y puentes de hidrógeno que existía entre los grupos hidroxilo, tiol, amina y maleimida. A medida que aumenta la concentración de quitosano, la propiedad del adhesivo es también mejor debido a la mayor cantidad de grupos tiol en el hidrogel, el dextrano, es otro material polisacárido ampliamente utilizado para aplicaciones adhesivas de hidrogel en usos biomédicos.

b) Basados en Proteínas

Un buen bioadhesivo también debe ser no tóxico y biodegradable. Gelatina y sus grupos amino de lisina son covalentemente entrecruzados con formaldehído o glutaraldehído, y restos aldehído pueden ser conectados a residuos de resorcinol por reacción de sustitución aromática electrofílica; asimismo, la Albúmina, una proteína que es un componente principal en el plasma sanguíneo humano, ha sido ampliamente utilizada como adhesivo tisular, también está reticulada con glutaraldehído, lo que conduce a una adhesión entre aldehídos y proteínas en el tejido. No obstante, los adhesivos de hidrogel basados en proteínas muestran algunas desventajas, dado que las proteínas se extraen de recursos animales o humanos y pueden causar infección o reacción alérgica.

c) Adhesivos Sintéticos

Estos materiales son biocompatibles y biodegradables. Sus propiedades mecánicas y de adhesión se pueden adaptar mediante una selección de agentes reticulantes y la optimización del tiempo de gelificación.

Polietilenglicol (PEG) es uno de los polímeros sintéticos más frecuentemente utilizados para el adhesivo de hidrogel, la adición de silicatos mejoró significativamente la fuerza adhesiva del hidrogel [69].

2.2.4.- HIDROGELES DE QUITOSANO Y POSIBLES APLICACIONES

El quitosano forma hidrogeles mediante enlaces cruzados iónicos o químicos con glutaraldehído. También, el quitosano derivado con azida forma geles mediante irradiación UV. Se han desarrollado numerosos derivados para alterar las funciones biológicas del quitosano, incluida la mejora de las interacciones celulares para los enfoques de ingeniería tisular.

El quitosano se ha modificado con residuos de azúcar como la fructosa o la galactosa para el cultivo de hepatocitos y con proteínas como el colágeno, la gelatina y la albúmina para la ingeniería del tejido neural. Se ha unido covalentemente a geles de agarosa para incorporar la carga en los geles, y esto también contribuye significativamente al crecimiento de las neuritas. Además, se ha informado que el quitosano derivado con metilpirrolidinona promueve la formación de hueso [67, 50].

Hoy en día existen numerosos avances biológicos asociados al quitosano, donde los más trascendentes para el presente trabajo se encuentran recopilados en la tabla 1.3.

Tabla 1.3. Esquema simplificado de obtención de quitosano a partir de conchas

AUTOR	APORTES	CONCLUSIONES
CARACTERIZACIÓN Y UTILIZACIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO OBTENIDOS A PARTIR DE CAMARÓN LANGOSTINO (PLEURONCODES PLANIPES) PARA EL CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS HUMANOS.		

<p>Andrés Sánchez Brenes Et. Al. (2006) [51].</p>	<p>El quitosano se obtuvo de cáscara de camarón langostino y quitina, purificando los productos mediante ácido acético y etanol. El hidrogel se realizó al 1 y 3% de quitosano en ácido acético, el entrecruzamiento fue por inmersión de la película en glutaraldehído y glioxal eliminando el exceso con lavados de etanol.</p>	<p>Los hidrogeles de quitosano entrecruzados absorben menos agua que los hidrogeles sin entrecruzar, los hidrogeles de quitosano entrecruzados con glioxal resultaron ser tóxicos. Se sugiere utilizar agentes entrecruzantes que no sean químicos y otra técnica de entrecruzamiento.</p>
<p align="center">PREPARACIÓN DE PARTÍCULAS DE QUITOSANO RETICULADAS CON TRIPOLIFOSFATO Y MODIFICADAS CON POLIETILENGLICOL.</p>		
<p>Cristóbal Lárez Velásquez Et. Al. (2006) [13].</p>	<p>Síntesis de Hidrogeles basados en quitosano y ácido itacónico. Producción de electrodos de pasta de carbón/quitosano, para análisis de trazas de metales.</p>	<p>Aplicaciones futuras como nano composites</p>
<p align="center">SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO OBTENIDO A PARTIR DE CAMARÓN LANGOSTINO (PLEURONCODES PLANIPES) CON POTENCIALES APLICACIONES BIOMÉDICAS.</p>		

<p>Andrés Sánchez Brenes Et. Al. (2006) [41].</p>	<p>Quitosano de desechos del camarón langostino (<i>Pleuroncodes planipes</i>) obteniendo hidrogeles del entrecruzamiento por inmersión de película con agentes químicos (glutaraldehído y glioxal)</p>	<p>Al no reticular el hidrogel se obtuvo buena elasticidad, consistencia lisa y regular, muy absorbente (aunque irregular al hincharse). Al emplear glutaraldehído 50% presentó rigidez, con superficie irregular en seco, hinchado se mantiene liso con baja absorción.</p> <p>Al utilizar glioxal 50% y conforme la concentración disminuye, disminuye su rigidez y rugosidad en seco pero la absorción mejora.</p> <p>Cuando los hidrogeles se entrecruzan, se impide la absorción de agua, debido a la presencia de una fuerza elástica de retracción de las cadenas poliméricas.</p>
--	---	---

PREPARACIÓN DE PARTÍCULAS DE QUITOSANO RETICULADAS CON TRIPOLIFOSFATO Y MODIFICADAS CON POLIETILENGLICOL.

<p>Nadia Rodríguez Hamamura Et. Al. (2010) [42].</p>	<p>Las partículas manométricas de quitosano se prepararon empleando quitosano de cáscara de cangrejo con un grado de desacetilación menor al 75% en ácido acético a pH de 4.6, se agregó polietilenglicol para formar soluciones de PEG-quitosano y gota a gota se agregó tripolifosfato de sodio (TPP), el entrecruzamiento se considera físico ya que está formado por el quitosano entrecruzado iónicamente por el TPP.</p>	<p>Se obtuvieron partículas coloidales de quitosano de tamaño 100 a 400nm con un grado de desacetilación y masa molar de 82% y 8.16 x10⁵ Da respectivamente. Las partículas de quitosano sin PEG mostraron una forma esférica, las modificadas con PEG mostraron formas irregulares. Al añadir PEG el tamaño de las partículas de quitosano aumenta. Los hidrogeles entrecruzados iónicamente no sólo se hinchan en medio ácido, sino también en bases.</p>
---	--	--

OBTENCIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO A PARTIR DEL MICELIO DE ASPERGILLUS NÍGER Y SU ESTUDIO EN LA LIBERACIÓN CONTROLADA Y SU ESTUDIO EN LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE CEFALEXINA.

<p>Elkin Libardo Romero Peñaloza Et. Al. (2011) [43].</p>	<p>El quitosano se extrajo de la quitina presente en el micelio <i>Aspergillus niger</i> con un grado de desacetilación de 76.33% entrecruzado covalentemente con glutaraldehído por reacción de entrecruzamiento químico.</p>	<p>Los hidrogeles resultantes presentaron una respuesta selectiva al pH de la solución, ya que el grado de hinchamiento aumentó a medida que el pH disminuía. El tamaño de poro exhibió mayor absorción, dicho comportamiento se presentó a menor porcentaje de agente entrecruzante.</p>
<p>PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA Y ESTRUCTURAL DE UN GEL CONDUCTOR A BASE DE QUITOSANO.</p>		
<p>Valentina Cardona Trujillo Et. Al. (2012) [40].</p>	<p>Se utilizó quitosano comercial (mediano peso molecular con grado de desacetilación de 75-85%) al 1% en ácido acético. El entrecruzamiento se dio por glutaraldehído, la reacción de entrecruzamiento ocurre en medio acuoso vía reacción de Schiff.</p>	<p>Fue posible obtener biopolímeros con un grado de entrecruzamiento entre 3 y 12% de glutaraldehído por quitosano. Posibles estudios de la estabilidad vía modificación química.</p>

En la actualidad el auge de esta investigación no solo se limita al uso de quitosano y por ende las aplicaciones se han visto enfocadas en diversos campos de la ingeniería moderna, entre dichas investigaciones resaltan las realizadas en 1994 por *Donald H. Lorentz* y colaboradores. Donde patentaron una fórmula de un hidrogel adhesivo para la piel con múltiples aplicaciones que incluyen cortinas quirúrgicas, vendajes y empaques para heridas y quemaduras, yesos, administración transdérmica y de iontoforesis, barreras antimicrobianas para cubos de catéteres, electrodos, mascarillas entre otros. Este adhesivo se sintetizó a partir de una polivinilpirrolida (PVP) reticulada y ácido carboxílico, debido a la apertura del anillo (hidrólisis), en una solución acuosa de polietilenimina, logrando la formación de un gel; el cual no resulto soluble en exceso de agua, pero se expandió en el medio. Generaron un gel conductor añadiendo KCl al agua antes de disolver el anillo abierto PVP [70]

Jeanie L. Drury y colaboradores en 2003, evaluaron variables de diseño de hidrogeles como andamio en ingeniería de tejidos. Evaluaron tres tipos de Andamios:

1.1 Andamio de relleno de espacios:

Encontrando como requerimientos para el diseño de estos hidrogeles que proporcionen volumen manteniendo la integridad estructural durante el tiempo requerido, eviten adherencias o contrariamente funcionan como bioadhesivos. Los andamios compuestos de alginato, quitosano y colágeno mostraron un potencial de uso como agentes de carga generales, los geles de quitosano foto-entrecruzados no parecen ser tóxicos *in vitro* y se han utilizado eficazmente para sellar heridas pequeñas.

2.1 Andamios para la entrega de moléculas bioactivas:

Evaluaron microesferas de quitosano reticuladas con glutaraldehído empleado para la liberación de fármacos; encontrando que el alginato reticulado iónicamente ha sido el material de hidrogel de elección para la encapsulación de células porque es relativamente no degradable, las células se pueden mezclar fácilmente con él antes de la gelificación, y se gelifica en condiciones suaves. Para aumentar la difusión de oxígeno realizó una inmovilización de la hemoglobina en la matriz de alginato de la microcápsula con alto potencial como un método para tratar la diabetes, así como una gama de enfermedades que involucran otras hormonas y enzimas deficiencias.

3.1 Andamios para la entrega y regeneración celular:

Los andamios de hidrogel se están utilizando en un intento de diseñar una amplia gama de tejidos, incluyendo cartílago, hueso, músculo, grasa, hígado y neuronas. Los hidrogeles tienen una estructura macromolecular similar a cartílago, que es un tejido altamente hidratado compuesto de condrocitos (células que se encuentran en el cartílago) incrustados de colágeno, que se encargan de mantener la matriz cartilaginosa, produciendo sus principales compuestos: colágeno y proteoglicanos. El alginato se ha usado más ampliamente *in vivo* como andamio de cartílago donde en estudios, se ha mezclado con condrocitos.

El autor sugiere evaluar otros métodos de entrecruzamiento, para mejorar la biocompatibilidad, así como controlar las propiedades mecánicas. Del mismo modo,

un pre y post procesamientos para controlar la porosidad; y así, mejorar la difusión e incorporar suavemente las células al andamio [71].

Yoshihiko Murakami y colaboradores en 2006, prepararon con éxito un hidrogel para aplicación como adhesivo tisular a base de una micela polimérica reciclable. Su desarrollo consistió en la elaboración de dos tipos de micelas; una consistía en aldehído-poli(etilenglicol) (PEG) –ácido poliláctico (PLA) y el otro consistía en acetaldehído (90% w/w%) -PEG-PLA y el hidrogel a base de polialilamina.

Donde el método A empleado para la aplicación simultánea de la micela polimérica y las soluciones de polialilamina sobre el peritoneo de ratones (figura 3.a), y el método B, que involucró la aplicación de la solución que contiene la micela polimérica y la polialilamina sobre el peritoneo de los ratones y la adición de carbonato de sodio para que el pH aumentara (figura 1.3.b).

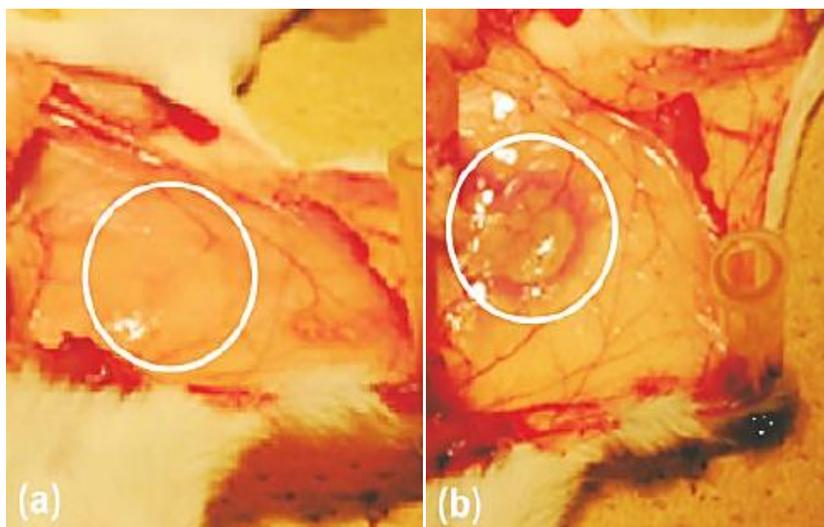


Figura 1.3. El hidrogel que se adhiere al peritoneo de un ratón [(a) Método A y (b) Método B]. El círculo blanco muestra el hidrogel formado [72].

Se encontró que los componentes de las micelas poliméricas (PEG y PLA) no son citotóxicos y biocompatibles, por lo que el adhesivo no conlleva un riesgo de transmisión de contaminaciones infecciosas, ya que consiste únicamente de materiales sintéticos. Aunque una micela polimérica terminada en aldehído ha sido uno de los portadores funcionales útiles en los sistemas de administración de fármacos, se sugieren investigaciones futuras que prueben la biocompatibilidad del hidrogel a

detalle, además de la evaluación de otras poliaminas tales como poli (aminoácido) y quitosano y las propiedades de estos hidrogeles [72].

Blanka Sharma y colaboradores en 2013, diseñaron un hidrogel de polietilenglicol-diacrilato (PEGDA) para producción de matriz de cartílago, al que se le incorporó ácido hialurónico lineal de alto peso molecular para aumentar la viscosidad de la solución prepolimerizada y para reducir el derrame, facilita su aplicación quirúrgica. Demostrando en un modelo in vitro el depósito de la matriz extracelular específica del cartílago en el biomaterial de hidrogel, así como la estimulación del desarrollo del tejido del cartílago adyacente por las células madre mesenquimales. Adicionalmente, se aplicó adhesivo de acondroitin sulfato para unir covalentemente, logrando adherir el hidrogel al cartílago y al tejido óseo en defectos articulares. No observaron eventos adversos importantes en su estudio [73].

Bum Jin Kim y colaboradores, crearon en 2014 un sistema de hidrogel basados en polímeros reticulados materiales que proporcionan adhesión y cohesión en medio ambiente húmedo, útil en la formulación de adhesivos tisulares. Inspirados por la adhesión de mejillones marinos, investigaron la molécula 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) como reticulante logrando un endurecimiento cohesivo y unión adhesiva con diversas superficies. Adicional a los residuos de DOPA, la composición de otros residuos de aminoácidos y la estructura de las proteínas adhesivas del mejillón (MAP) representaron un novedoso sistema de hidrogel basado en proteínas que emplean DOPA que contiene MAP recombinante.

La gelificación se puede lograr utilizando tanto la reticulación no covalente mediada por DOPA-quinona inducida por oxidación como la coordinada no covalente mediada por Fe^{3+} (figura 1.4). Los hidrogeles mediados por Fe^{3+} mostraron un comportamiento viscoelástico deformable y autocurativo en el análisis reológico. Los hidrogeles mediados por Fe^{3+} muestran un comportamiento viscoelástico deformable y autocurativo en análisis reológico. El hidrogel mediado por quinona generó una mayor fuerza cohesiva y puede proporcionar suficiente tiempo de gelificación para un manejo más fácil. En conjunto, su hidrogel MAP tiene potenciales capacidades para uso como adhesivo tisular y sellador para aplicaciones futuras [74].

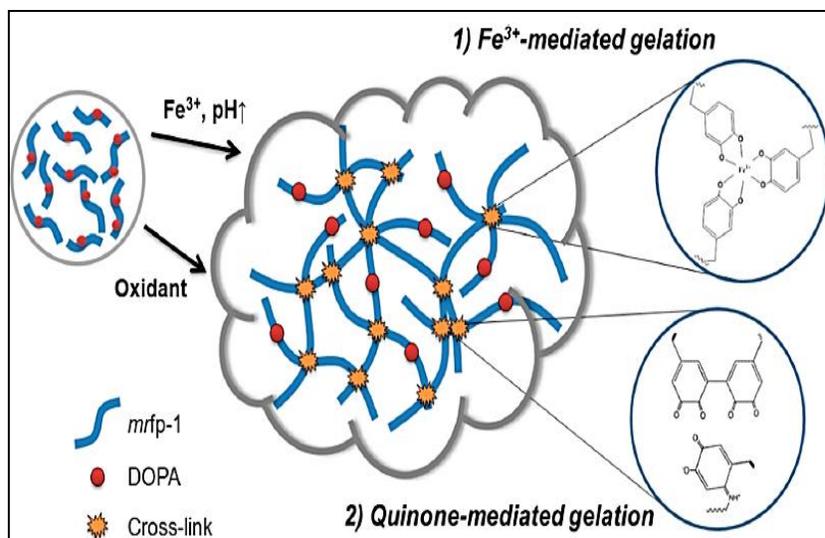


Figura 1.4. Representación esquemática del proceso de gelificación basado en MAP vía cruzamiento no covalente mediado por coordinación Fe^{3+} -DOPA o DOPA [74].

Vivian H. M. Mouser y colaboradores en 2017, evaluaron el efecto de la distribución espacial de condrocitos en la reparación de cartílago en un modelo *ex vivo* (sobre tejidos biológicos en un entorno artificial fuera del organismo con alteraciones mínimas de las condiciones naturales), creando defectos de cartílago en tapones osteocondrales equinos. Los defectos se llenaron con (a) condrocitos en la parte inferior del defecto, cubierto con un hidrogel sin células, (b) condrocitos encapsulados homogéneamente en un hidrogel y (c, d) combinaciones de a y b con diferentes densidades celulares, en la condición d, la concentración celular fue el doble que la de la condición c. Encontraron mejores resultados bajo las condiciones c y d, que dieron como resultado un tejido del cartílago bien integrado y llenando el defecto, independientemente de la densidad celular inicial.

Por ello, al emplear los tapones osteocondrales estimularon la formación de cartílago en los hidrogeles al cultivarlos en los defectos, obteniendo tejido de reparación a partir de las células administradas, ventajosamente usan el modelo *ex vivo* para reducir las pruebas en animales; contrario a esto es necesario realizar un defecto en el cartílago a una cierta profundidad para estimular la regeneración del cartílago [75].

Maryam Dargahi y colaboradores en 2017, evaluaron la absorción de tintes catalíticos. Un novedoso hidrogel superabsorbente nanocompuesto basado en κ -carragenano y

cloruro de nano-plata sintetizado por un método fácil que incluye la polimerización por radicales libres y la carga de la plata e iones cloruro. El hidrogel compuesto se preparó en base a κ -carragenano y ácido acrílico en presencia de caolín utilizando persulfato de amonio (APS) como iniciador de radicales libres y metilenbisacrilamida (MBA) como reticulante hidrófilo (figura 1.5). La incorporación de caolín mejora algunas propiedades del compuesto súper absorbente, como la porosidad, la resistencia del gel, las propiedades mecánicas y térmicas.

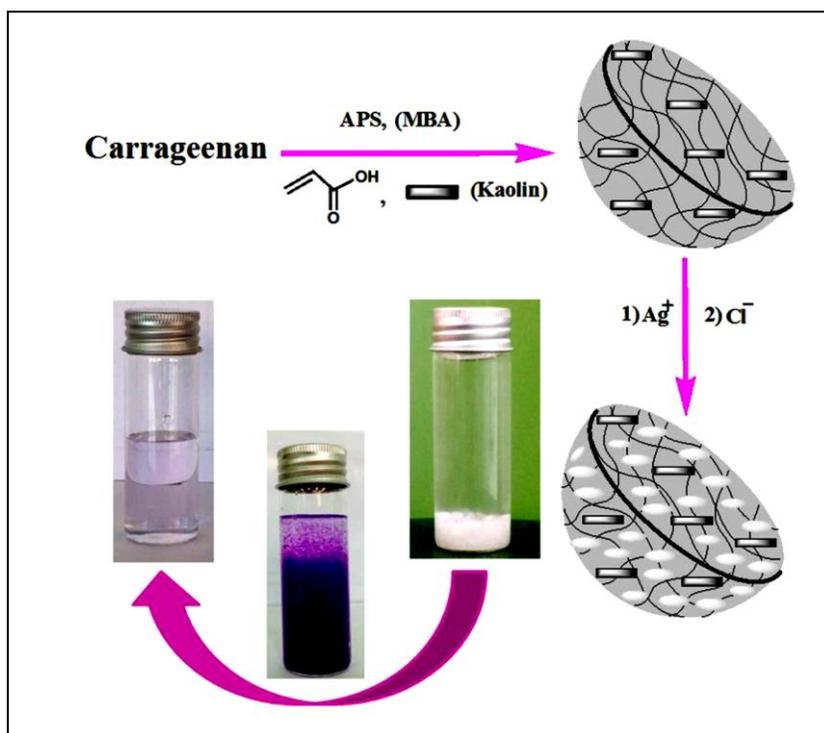


Figura 1.5. Representación esquemática de la preparación y absorción de hidrogel compuesto de κ -carragenano-g-ácido acrílico-caolín / cloruro de nano-plata [65].

Para sintetizar los hidrogeles de nanocompuestos, los hidrogeles completamente hinchados se sumergieron en la solución de nitrato de plata. Los iones de plata están localizados en todas las redes de hidrogel debido a una fuerte interacción de los iones de plata con los grupos sulfato, hidroxilo y carboxilato en la red de hidrogel. Después de cargar los iones de plata, los hidrogeles se añadieron a la solución de haluro de sodio. Se obtuvieron las nanopartículas de haluro de plata bien dispersas en las redes de hidrogel. El hidrogel nanocompuesto es estable y efectivo a la eliminación de colorantes catiónicos de soluciones acuosas [65].

Sánchez Duarte y colaboradores en 2017 generaron un hidrogel de quitosano a partir de cáscara de camarón para ensayos de adsorción de cobre y, el quitosano fue obtenido del exoesqueleto de camarón por medio del método químico, que involucra tres pasos: desmineralización, desproteización y desacetilación del exoesqueleto. En la desmineralización, el exoesqueleto de camarón se colocó en una solución de HCl 1M y se agitó mecánicamente por 4h a temperatura ambiente. En la desproteización, el exoesqueleto de camarón se introdujo en una solución de NaOH 4.5% y se agitó mecánicamente a 65°C en baño de aceite por 4h. Finalmente, en la desacetilación, el exoesqueleto se agitó mecánicamente en una solución de NaOH 45% a 110°C en baño de aceite por 2h. Después de cada paso, las muestras fueron lavadas con agua hasta tornarse neutras. El quitosano obtenido se secó a temperatura ambiente y se almacenó.

Crearon 3 tipos de perlas de hidrogel de las cuales, para la síntesis de perlas de quitosano entrecruzadas con tripolifosfato de sodio, prepararon una solución de quitosano al 2% en ácido acético al 1.5%. La solución de quitosano se agregó por goteo en una solución de tripolifosfato de sodio al 1%, formándose las perlas de quitosano entrecruzado con tripolifosfato. Después de reposar por 12h, las perlas resultantes se lavaron con agua destilada y se almacenaron. Para la obtención de quitosano puro (*q-puro*), la solución de quitosano se goteó en una solución de NaOH al 0.5 M, las perlas resultantes se dejan reposar 16 h. Posteriormente, se lavaron con agua destilada hasta alcanzar un pH 7 y se almacenaron. Finalmente, para la síntesis de perlas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído (*q-GLU*), las perlas de quitosano puro se colocaron en una solución al 0.025 M de glutaraldehído y se dejaron reposar por 12 h, se lavaron con agua destilada y se almacenaron.

Obteniendo así condiciones óptimas de tratamiento por 4h, y un valor de pH= 4 y 4.5g de adsorbente (*q-puro*). El hidrogel de *q-puro* obtenido en forma de perlas es potencialmente aplicable como un adsorbente efectivo en la remoción de cobre presente en lixiviados de minas [50].

Feifei Xin y colaboradores en 2018 sintetizaron hidrogeles mediante polimerización de radicales libres, mediante un polímero hidrofílico tridimensional llamado poliisopropilacrilamida (PNIPAAm). Debido a que experimenta transiciones de fase hidrofílicas / hidrofóbicas reversibles a la temperatura de solución crítica baja (LCST) cercana a la temperatura ambiente, e hibridando con otros aditivos, basados en calor, voltaje, luz y solventes de hidrogeles de PNIPAAm sensibles.

Buscando desarrollar aplicaciones viables en ventanas inteligentes, encontrando aplicaciones limitadas debido a su baja biocompatibilidad y citotoxicidad. Encontraron que al agregar gelatina modificada por anhídrido maleico (MAH) un polímero natural con excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad que contiene grupos amino libres en la cadena de ramificación permite introducirse a otros grupos funcionales mediante la reacción de acilación (alcanoilación) en el hidrogel PNIPAAm (figura 1.6) permitiendo que los grupos carboxilo se coordinen con los iones metálicos (Na^+ , Mg^{2+} , Al^{3+}) [76] y que podría permitir abrir una nueva puerta a estos materiales en las aplicaciones biomédicas.

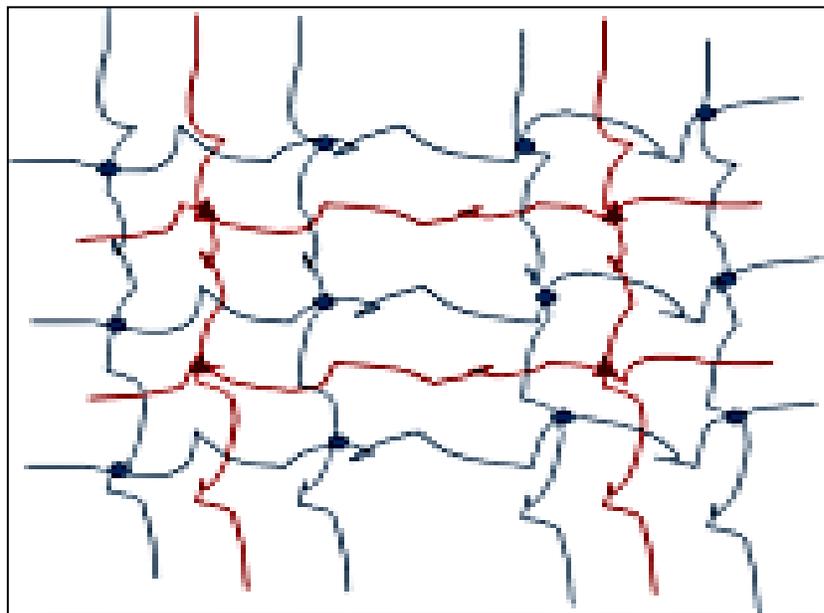


Figura 1.6. Estructura de redes poliméricas de doble red (DN): primera red azul (mayor entrecruzamiento), segunda red rojo (menor entrecruzada), hidrogel con propiedades mecánicas superiores [76].

Gudrun Schmidt y colaboradores en 2018 generaron un adhesivo basado en zeína (proteína de prolamina encontrada en maíz) y fenólicos extraídos de plantas (figura 1.7).

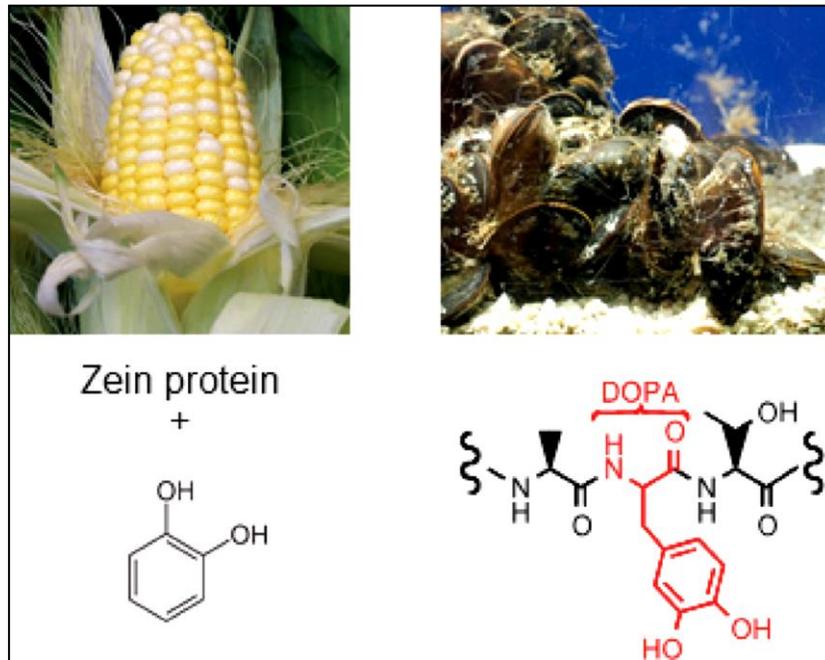


Figura 1.7. La proteína zeína se puede reticular con fenólicos vegetales para imitar la química de adhesión de los mejillones marinos. A la izquierda: molécula de catecol y el maíz utilizado para extraer la proteína zeína. A la derecha: mejillones que se unen a una superficie de vidrio [77].

Prepararon soluciones de polímero de zeína de 45% en peso de zeína en polvo, 37% en peso de etanol, y 18% en peso de agua desionizada (pH 7 ajustado con NaOH). La solución resultante se mezcló con el componente parental catecol o un componente fenólico. La mezcla producía un gel de alta viscosidad transparente, esta mezcla se usaba como adhesivo. El disolvente añadido se dejó evaporar hasta que la mezcla volvió a su estado viscoelástico.

Estos adhesivos muestran que los componentes benignos de los alimentos pueden proporcionar un rendimiento comparable con materiales derivados del petróleo en el uso actual y gran difusión. Estudios futuros del autor siguen exámenes de persistencia de enlace en sustratos sumergidos bajo el agua [77].

Debido a sus diversas actividades biológicas, sus propiedades biodegradables, naturaleza policatiónica y biocompatibles, característica principal que posee, hoy en

día ha cobrado una gran importancia en la versatilidad de aplicaciones dentro del campo de las aplicaciones biomédicas. Obviamente, no cualquier material puede ser empleado como biomaterial y en concreto biomateriales enfocados para ser utilizados en seres vivos, ya que su estudio es un tema en auge indiscutible en la actualidad y que ha experimentado un espectacular avance en los últimos años. Motivado fundamentalmente por el hecho de que la esperanza de vida de la población aumenta de forma considerable [21].

2.2.5.- HIDROGELES Y SU USO EN INGENIERÍA TISULAR

En la actualidad, más de cincuenta millones de personas en todo el mundo tienen implantado algún tipo de prótesis y es un hecho bien conocido en nuestra sociedad la utilidad y necesidad de todo tipo de implantes. Siendo relativamente frecuente que conozcamos algún caso de familiar o amigo que esté utilizando algún dispositivo biomédico desde prótesis dentales, dispositivos anticonceptivos, implantes siliconados, catéteres entre otros.

Según datos de las Naciones Unidas, dentro de unos cinco años es muy probable que haya más personas de más de 60 años que niños menores de 15. Hoy en día una de cada diez individuos tiene 60 años o más, pero para el año 2050 se prevé que será uno de cada cinco. También se prevé que el número de personas que tendrán 80 años se multiplicará por cinco. La longevidad masiva tiene implicancias muy importantes relacionadas con mantener la calidad de vida, y ello supone que harán falta más y más dispositivos biomédicos fabricados con biomateriales, donde la Ingeniería tisular juega un papel crucial, he ahí la importancia de su estudio [21].

La Ingeniería Tisular, es una especialidad de la Biomedicina, cuyo objetivo principal es diseñar estructuras biológicas funcionales para sustituir, reparar o regenerar tejidos dañados, ya sea parcialmente o en su totalidad. Por lo que hoy en día es una área altamente interdisciplinaria, ya que precisa de la colaboración de expertos en ciencias de la vida, químicos, físicos e ingenieros para resolver problemas clínicos y quirúrgicos, en este contexto, el término ingeniería se encarga de agrupar las estrategias para la formación de estructuras funcionales, es decir, los factores

necesarios para la regeneración del tejido dañado logrando la interacción entre la parte química física y biológica [14, 78].

Donde se han empleado materiales cuyas propiedades los han catalogado como “Biomateriales” que según una de las definiciones más completas los clasifican como; “materiales sintéticos empleados para reemplazar parte de un sistema vivo o que se encuentra en íntimo contacto con fluidos biológicos” [21], obviamente, no cualquier material puede ser inscrito dentro de esta clasificación ya que se considera primordial una característica muy especial, la biocompatibilidad. Aun cuando los estudios de la regeneración ósea y de tejidos se remontan desde el siglo XVII, su evolución se ha visto determinada por cuatro etapas trascendentales, el primer proceso buscó equiparar las propiedades mecánicas, sin que el material reaccionara biológicamente con el medio que lo rodea; posterior a este en el segundo periodo se logró pasivar el material mediante una reacción con el medio circundante, en la tercera generación se optó por adaptar el material al medio y no viceversa, donde actualmente y en el cuarto periodo, el objetivo consiste en lograr la interacción e integración del material en el medio, generando una respuesta celular apropiada que permita el crecimiento tisular y el transporte de nutrientes y factores de crecimiento en tiempos específicos sin afectar el cuerpo humano [20].

Adicional a estos factores la llegada de la nanotecnología ha aportado materiales inteligentes a las ciencias de la salud y en particular a la regeneración ósea y de tejidos [79]. Donde hoy en día uno de los grandes retos reside en el desarrollo de nanopartículas dirigidas específicamente a subsanar necesidades óseas o de tejidos, evitando efectos secundarios de tratamientos existentes, pérdida total o parcial de funciones, baja o nula biocompatibilidad de materiales y deficiencia en las propiedades mecánicas de materiales ya existentes.

2.3.- NANOFIBRAS

Las nanofibras son estructuras, delgadas, alargadas y filiformes que poseen dos de sus dimensiones dentro de la nanoescala, es decir, en el orden de una millardésima parte de una unidad métrica (10^{-9}). Su principal ventaja frente a sus equivalentes de

mayor tamaño (micro y macro fibras) radica en elevar su relación área/volumen, por ende, una mejora en propiedades asociadas a su morfología (que define sus propiedades hidrofóbicas), estructura molecular (propiedades ópticas y térmicas), propiedades mecánicas (resistencia, estabilidad y flexibilidad) y químicas, lo que le da un amplio campo de aplicación dentro de la industria de la seguridad, ingeniería ambiental, biotecnología e ingeniería de tejidos [80].

Numerosos estudios recientes se han centrado en la obtención de membranas fibrosas como medio de liberación controlado de fármacos dentro de la industria biomédica, basado en el entendido, que las fuerzas de Van der Waals son responsables de la adherencia entre las fibras y los compuestos químicos capturados. Algunos polímeros como el caso del quitosano presentan capacidad complejante a través de interacciones específicas de los grupos $-NH_2$ [81, 82, 83].

2.3.1.- PRINCIPIOS BÁSICOS DEL “ELECTROSPINNING”

En general la técnica del electrohilado consiste en utilizar un campo eléctrico de alto voltaje para generar una serie de fibras ultrafinas por medio de estiramiento coaxial de una solución viscoelástica usando polímeros sintéticos o naturales [84, 85].

El proceso del electrohilado consiste en aplicar un potencial eléctrico sobre una superficie que recibe pequeñas gotas de una solución polimérica. Cuando las gotas entran en contacto son cargadas en su superficie a medida que el campo eléctrico aumenta, la superficie pasa de una forma hemisférica a una esférica, y al final a una forma cónica, comúnmente conocida como cono de Taylor. Subsecuentemente, cuando la acumulación de repulsión de carga electrostática supera la tensión superficial de la solución, el polímero fluye del cono de Taylor al plato colector. El voltaje y el campo eléctrico aplicados al sistema afectan la morfología de la fibra y el diámetro, mientras que la orientación de las líneas de campo eléctrico tiene efecto en la orientación final de la fibra dentro de la estructura [86, 87]. Debido a que se aplica más fuerza y más resistencia para transformar la solución en un flujo continuo en forma de filamento, en cuyo caso, menos voltaje da como resultado fibras más delgadas. De entre los parámetros que la técnica tiene se pueden resaltar algunas propiedades de la solución como la viscosidad, concentración del polímero, conductividad eléctrica y

tensión superficial. Adicional a ciertas variables controlables, tales como el potencial eléctrico y la distancia entre capilar y plato colector. Sumado a implicaciones ambientales debidas a variaciones de temperatura y humedad.

Lo anterior resulta en fenómenos como el cizallamiento de la solución (flujo extensional), el movimiento del chorro en dirección al campo eléctrico y la evaporación del solvente [88]. Estos parámetros están íntimamente relacionados con las propiedades y características de las fibras obtenidas mediante *electrospinning*, por lo que su control durante la ejecución del proceso es indispensable, y juegan un papel importante en la formación y definición de la estructura de las fibras.

2.3.2.- NANOFIBRAS DE QUITOSANO

Hoy en día el enfoque de los materiales va encaminado a la generación de polímeros con una gran aceptación biológica, potenciando aplicaciones médicas, centrando estudios presentes y futuros en explotar biopolímeros como el quitosano, modificando su estructura y potenciando sus propiedades químicas y físicas, mediante la interacción con agentes que influyan de manera positiva en las propiedades deseadas.

Estudios como el de *Zonggang Chen et al.* en 2007 se desarrollaron con un enfoque que consistió en una solución de quitosano/colágeno en una mezcla de HFP/TFA donde el factor determinante fue la concentración de quitosano; encontrando una estructura más gruesa a medida que la concentración de la solución aumentó y se volvió fina con el aumento de la proporción de quitosano/colágeno, lo que generó una estructura con propiedades adecuadas como una matriz extracelular para desarrollo de biomateriales funcionales [89].

El equipo de *Homa Homayoni et al.* en 2009 generó soluciones del quitosano en ácido acético acuoso al 70-90% produciendo nanofibras con la calidad y estabilidad de procesamiento adecuadas mediante la técnica de electrospinning. El hallazgo fue un aumento en el diámetro medio de las nanofibras conforme disminuye la concentración de ácido acético en el disolvente. Esta modificación estructural altera la naturaleza química del polímero [90].

Estudios presentes como el desarrollado por *Sánchez Cepeda et al.* en 2016 realizaron membranas porosas a partir de policaprolactona y quitosano mediante la técnica de electrohilado para una potencial aplicación como liberador del clorhidrato de tiamina (Vitamina B1). En cuyo caso su sistema propuesto fue capaz de liberar desde 65% a 85% de clorhidrato de tiamina en un periodo de 60 h, aproximadamente, lo cual evidencia la potencialidad de estas membranas para liberar efectivamente a la vitamina B1 [91].

Yessica Cárdena Pérez *et al.* en 2017, se centró en el desarrollo de andamios de nanofibras de quitosano y fibroina del capullo de gusano de seda evaluando concentraciones de quitosano y fibroina en la morfología, encontrando como resultado de los andamios una alta adhesión celular, y estabilidad térmica, lo que mantiene su integridad y potencia su aplicación como andamio extra celular [92].

Como se puede evidenciar, los estudios del quitosano van encaminados a generar biopolímeros con alta capacidad de equiparar propiedades de tejidos y que a su vez optimicen procesos biológicos o de regeneración tisular. Esto abre la necesidad de incorporar nuevos agentes funcionales que aporten un aumento significativo en propiedades mecánicas, físicas y químicas, que faciliten la incorporación ósea de dichos componentes artificiales.

III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La finalidad de este estudio es generar nuevos materiales bajo un diseño preestablecido partiendo de un biopolímero portador de grupos amino para generar un biomaterial de nueva síntesis que posea propiedades de biocompatibilidad, así como adherencia, absorción y propiedades mecánicas aceptables para la aplicación como andamios celulares o de fármacos. Partiendo de procesos novedosos para generar biomateriales mediante entrecruzamiento químico de biopolímeros de tipo dicarbonílico.

El resultado esperado es un gel con propiedades biológicas y mecánicas aceptables que se comparará con la funcionalización química y electroquímica de quitosano para dar lugar a un biopolímero con una reactividad química específica, esperando mejorar sus propiedades para procesos específicamente de materiales biocompatibles. Además, evaluar propiedades de suma importancia en condiciones de ambientes biológicamente agresivos, donde factores como medios químicos y físicos, concentración de agentes, pH del medio y mecanismos de síntesis química y electroquímica pueden jugar un papel crucial en definir características. El aumento de la resistencia a la degradación proteolítica al ser implantados en un ente vivo, la adherencia en condiciones de alta humedad, elasticidad y dureza, estabilidad química, así como su estabilidad química y estructural que definirán el control en la liberación de fármacos por mencionar algunos; dichas propiedades son de suma importancia en la restauración tejidos biológicos sin sacrificar sus funciones.

Por tal motivo, se pretende sintetizar un biomaterial partiendo del estudio comparativo del entrecruzamiento y funcionalización de quitosano con agentes de tipo aldehído. Evaluando métodos químicos y electroquímicos de síntesis, controlando parámetros que influyen en las propiedades finales como concentración de quitosano, método de síntesis, concentración de agente, parámetros termodinámicos como el suministro energético de acuerdo a cada sistema y concentración de agente.

IV.- JUSTIFICACIÓN

La Ingeniería tisular es una de las disciplinas más jóvenes de la ingeniería en la que los principios y herramientas de la ingeniería, ciencia y tecnología se aplican a los problemas presentados por la biología, ingeniería y la medicina; que surge de la necesidad de la sociedad por preservar la calidad de vida por más tiempo, aumentando la longevidad y funcionalidad de los seres humanos.

Con ello surge la necesidad del diseño y producción de materiales que evolucionen y que sean útiles para la ingeniería tisular. El campo de los biomateriales se ha concentrado en el desarrollo de materiales que no sólo sean bioinertes, sino que sean capaces de interactuar de manera específica con el entorno biológico donde se encuentren (biocompatibles). Dichas investigaciones se han enfocado cada vez más en estudiar la relación específica entre las propiedades físico-químicas de los materiales y las proteínas, enzimas o moléculas biológicas; así como en observar las funciones celulares y determinar los parámetros fisiológicos requeridos. De allí que las nuevas tecnologías y estrategias se centran en concentrar diversas disciplinas como la biología, medicina e ingeniería que trabajan en semejar funciones de entes vivos con una mayor durabilidad.

Por ello, materiales con propiedades como biocompatibilidad, biodegradables, inertes, no tóxicos, solubles y con estabilidad química y física han sido enfoque de estudios dirigidos a esta área; debido tanto a sus excelentes propiedades biomecánicas como a su baja tasa de biodegradación, por lo que el quitosano es uno de los materiales más empleados dentro del campo de las aplicaciones médicas y biológicas. Los andamios de quitosano funcionalizados han demostrado mantener, reforzar y en algunos casos organizar la regeneración tisular. Como matriz puede ser utilizada para liberar materiales bioactivos o influenciar directamente el crecimiento celular.

Es por esto que el propósito de este trabajo es diseñar y evaluar un método de síntesis de nuevos biopolímeros partiendo de quitosano, que aunado a sus propiedades mecánicas y biocompatibilidad, sean aplicables en la creación de andamios dentro de la regeneración de tejidos, se vean potencializados mediante métodos novedosos de

funcionalización y entrecruzamiento por técnicas químicas y electroquímicas. Todo ello, en presencia de agentes químicos de tipo aldehído y evaluando parámetros que repercutan en las propiedades finales del biomaterial.

Así, la importancia de los resultados de este proyecto doctoral radica en la generación de mayor conocimiento en cuanto a los mecanismos de entrecruzamiento y de funcionalización; además, la generación de nuevos compuestos de quitosano con agentes químicos entrecruzantes planteados, evaluando la influencia de los procesos de síntesis y sus debidas condiciones en las propiedades finales. Así mismo, evaluar la influencia del proceso en las propiedades finales y en la medida de lo posible, plantear su aplicación como andamios en regeneración de tejido de tipo humano evaluando a su vez la posible expansión a aplicaciones en lo que respecta a la ingeniería de tejidos u otras aplicaciones. Finalmente, se pretende brindar información nueva acerca de las propiedades, condiciones y mecanismos empleados; lo cual se puede evidenciar, en un futuro, en procesos dentro del campo de la generación de biomateriales.

V.- HIPÓTESIS

Los biopolímeros obtenidos mediante la funcionalización y entrecruzamiento por métodos químicos y/o electroquímicos, a partir de quitosano empleando agentes de tipo dicarbonílico, darán como resultado, materiales con propiedades mecánicas aceptables, adherencia y estabilidad mejorada para su posible aplicación como andamios en ingeniería tisular.

VI.- OBJETIVOS

6.1.- OBJETIVO GENERAL

Obtener biomateriales de quitosano a partir de quitina proveniente de exoesqueletos de artrópodos con propiedades adecuadas para su posible aplicación como andamio celular dentro de la regeneración de tejido mediante el entrecruzamiento y la funcionalización química y electroquímica de un biopolímero portador de grupos amino y agentes químicos de tipo dicarbonílico.

6.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Extraer quitosano a partir de exoesqueletos de artrópodos mediante el método químico y electroquímico.
2. Realizar el entrecruzamiento de quitosano con agentes químicos entrecruzantes de tipo dicarbonílico mediante síntesis química, electroquímica y mecano-síntesis, evaluando factores que afectan la reacción de entrecruzamiento como:
 - Grado de desacetilación.
 - Peso molecular.
 - Tipo de agente entrecruzante.
 - Concentración de agente entrecruzante.
3. Realizar la funcionalización de quitosano por técnicas químicas y/o mecanoquímicas empleando metilgloxal, evaluando factores importantes como:
 - Grado de desacetilación.
 - Concentración de quitosano.
 - Concentración de aldehído.
4. Caracterizar el quitosano funcionalizado, mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), con el fin de elucidar estructuralmente los biomateriales obtenidos.

-
5. Caracterizar los productos obtenidos a diferentes condiciones de entrecruzamiento, por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), Viscosimetría y Difracción de Rayos X (DRX).
 6. Evaluar las propiedades biomecánicas mediante ensayos de tensión y compresión que permiten realizar predicciones sobre el comportamiento, resistencia, fatiga y otros aspectos a los que se somete el material en diferentes partes del cuerpo, adherencia y composición química del biomaterial obtenido, para su potencial aplicación como andamio en regeneración de tejidos.

VII.- METODOLOGÍA

Este trabajo se centra en la generación de biomateriales mediante los procesos de entrecruzamiento y funcionalización a base de quitosano, con agentes químicos (glioxal, glutaraldehído y metilglioxal), evaluando factores dentro del proceso que repercuten en las propiedades finales de este material. Por tal motivo se ha planteado el desarrollo experimental bajo la siguiente secuencia, dicho proceso se esquematiza en la figura 1.8.

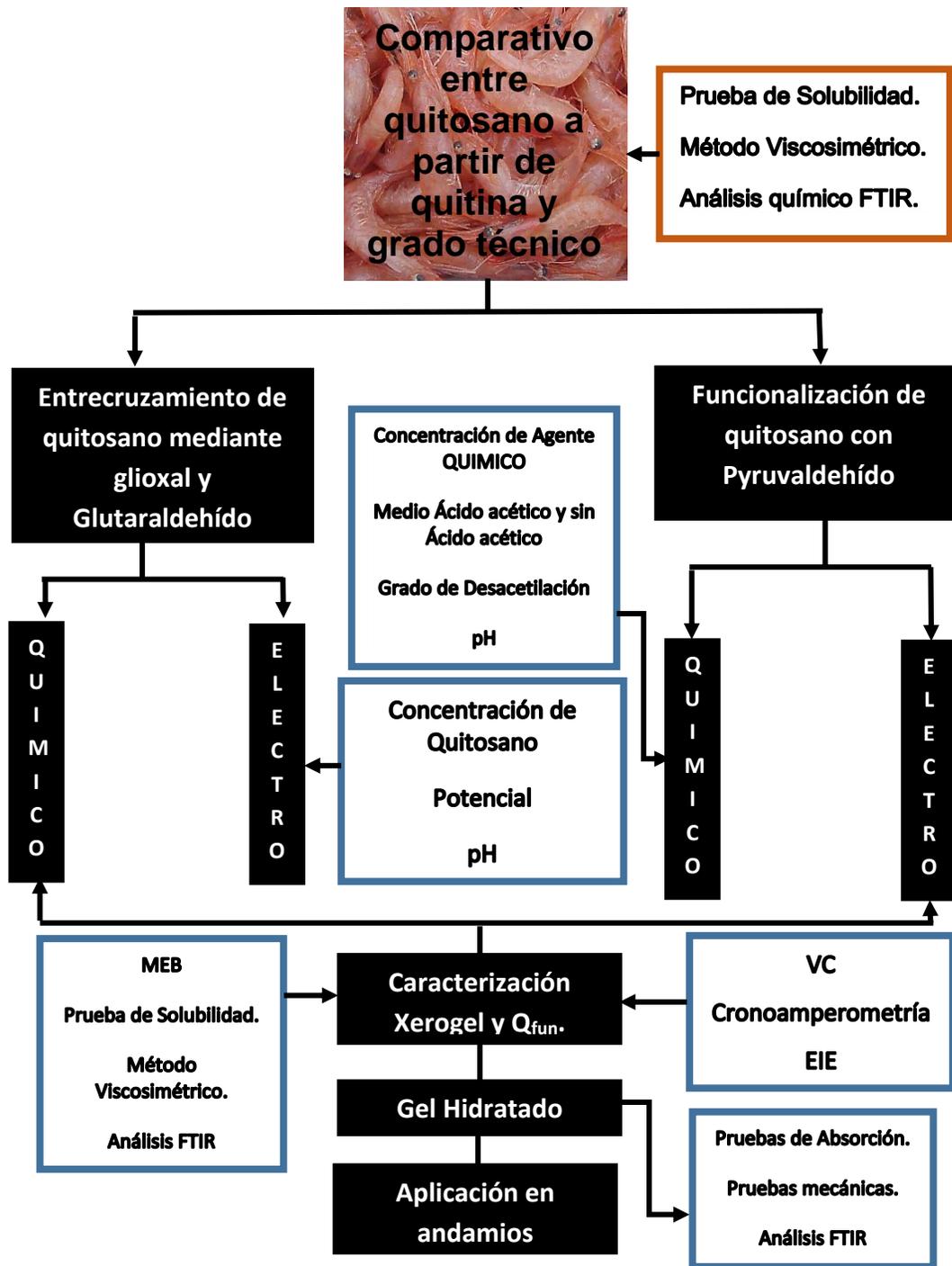


Figura 1.8. Diagrama de flujo del proceso de síntesis de quitosano.

7.1.- OBTENCIÓN DE QUITOSANO Y QUITINA

Se realizó el proceso de obtención de quitina llevando a cabo un estudio comparativo entre el método químico heterogéneo usando la reacción de hidrólisis, donde se empleó con el fin de desproteínizar NaOH 5M durante 5 horas, HCl 1M para desmineralizar, durante 2 horas y 50 ml de Etanol para eliminar los pigmentos restantes. Además, se utilizaron dos procesos electroquímicos que consistieron en una electrólisis forzada llevada a cabo con NaOH 2M en HCl, asistida con un potencial de 30 V en un sistema de dos electrodos (empleando titanio como ánodo y titanio recubierto con RuO₂ como cátodo), y un sistema de depósito electroquímico mediante hidrólisis de la cáscara de camarón en ácido acético al 0.3N a potenciales de reducción de -1 a -1.5V.

7.1.1.- METODO QUÍMICO

i) Proceso de desproteínización:

Las extracciones se realizaron a partir de lotes de 200 g en peso seco de animales de filo invertebrados (artrópodos), separando por especies.

En el caso de camarón se separó el cuerpo carnoso del exoesqueleto antes de proceder a un lavado con abundante agua. Posteriormente se realizó una reducción de tamaño con el fin de homogenizar y aumentar el área superficial (Figura 1.9).



Figura 1.9. Cáscara de camarón triturada.

La muestra triturada se lavó con agua un total de cinco veces con un volumen aproximado de 1 litro en cada lavado, finalmente la muestra se dejó reposar en 1 litro de agua destilada durante 24 horas a 4°C, para posteriormente eliminar la máxima cantidad de agua posible de las muestras (exprimiendo) y se procedió a un secado a 45°C por 24 horas. A continuación, se depositó el polvo en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, aforando a un volumen de 500 mL y creando una solución con NaOH al 5 molL⁻¹ a un pH > 13 y calentando a una temperatura de 62°C ±1° con agitación constante de 300 rpm durante 2 h en un agitador automatizado (Thermo Scientific modelo MaxQ 4450), en este paso las muestras se liberan de todas las proteínas presentes (Figura 1.10).



Figura 1.10. Desproteinización de la cáscara de camarón mediante NaOH.

Después del tiempo mencionado, se retiró el NaOH y se realizaron lavados del sólido suspendido usando agua destilada y sometiendo a agitación con magneto en parrilla eléctrica a 950 rpm durante 30 min, esto se repite hasta alcanzar un pH de 7 después se filtra la muestra empleando un tamiz de maya ultrafina, el sólido recuperado se compacta lo máximo posible, con este proceso se elimina por completo el NaOH.

ii) Proceso de desmineralización:

Para desmineralizar la muestra se vierte en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, creando una solución de 500 mL de HCl 1 molL^{-1} a un pH de 2, posteriormente se calentó a $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$, con una agitación de 300 rpm durante 2 h. Pasado este tiempo se filtró el HCl. Para eliminar el exceso de ácido se realizaron lavados con agua destilada hasta alcanzar un pH de 7. Después es necesario comprimir y secar a una temperatura de 45°C (Figura 1.11).

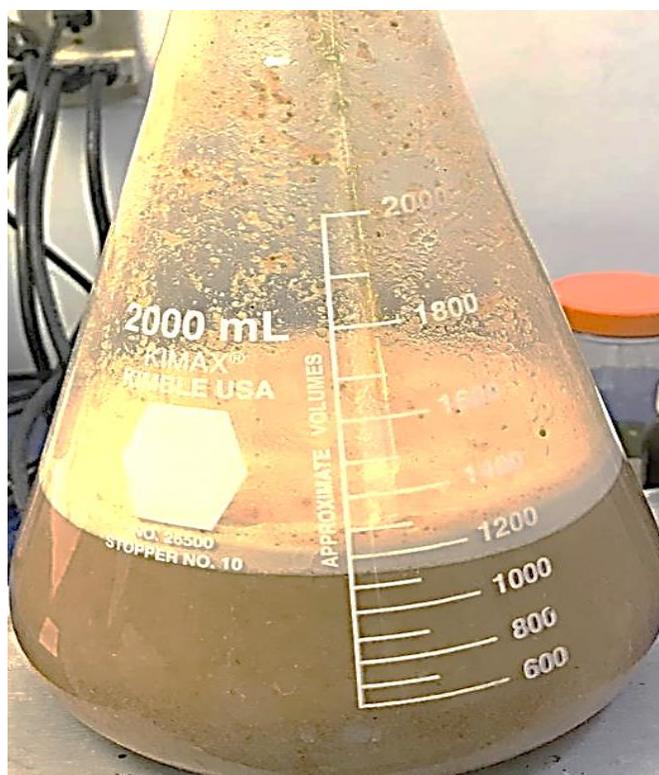


Figura 1.11. Desmineralización de la cáscara de camarón mediante HCl.

iii) Proceso de despigmentación:

Para obtener la quitina se procede a verter la muestra en un matraz erlenmeyer y se agregan 100 mL de etanol puro, se deja reposar a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ durante 24 h a agitación constante de 200 rpm.

Pasado este tiempo se retira el etanol, y se lava la quitina con agua destilada como se describió anteriormente. Al final del último lavado se deja nuevamente en 100 mL de etanol modificando la temperatura a 37°C durante 48 h, con lo cual se logró eliminar los colorantes naturales de la quitina (Figura 1.12).



Figura 1.12. Despigmentación (a) pigmentación antes del proceso, (b) pigmentación después del proceso.

Finalmente se retira el etanol y excesos del mismo mediante lavados a la quitina, la cual, una vez separada, se expande en un refractario de vidrio y se seca en estufa a 35°C durante 3-4 días. La quitina resultante se sometió a análisis y caracterización.

iv) Desacetilación de α -quitina:

Para lograr hidrolizar los grupos acetilos y generar el quitosano, se prepara una solución con la quitina y NaOH a la concentración de 4 molL⁻¹ y se lleva a 121°C y 15 libras de presión durante 2 h; después se separa el sobrenadante (quitosano combinado con el NaOH) y el sedimento (quitina) (Figura 1.13).



Figura 1.13. Muestra de productos del proceso de desacetilación con NaOH.

El sobrenadante debe mostrar un pH >13, por lo que para poder separar el quitosano del NaOH es necesario neutralizarlo y someterlo a diálisis contra agua destilada en membrana. Dicho proceso se realiza empleando 5 mL del sobrenadante obtenido, en una membrana de diálisis con 5 L de agua destilada y con agitación; cada 30 minutos se requiere medir el pH, cambiando el agua hasta que alcanzar un pH 7. Después se retira la membrana, se vacía en un vaso de precipitado y se neutraliza el pH por completo, para posteriormente secar la muestra en estufa a 40°C durante 48 h.

Cabe destacar que una vez neutralizada la muestra se puede observar en el interior de la membrana la aparición de pequeñas fibras de quitosano (Figura 1.14).



Figura 1.14. Partículas de quitosano en la solución neutralizada.

7.1.2.- METODO DE ELECTRÓLISIS FORZADA

Se realiza el proceso de obtención de quitina mediante digestión ácida utilizando para ello ácido acético a una concentración de 0.3 molL^{-1} , con el fin de desproteinizar y desmineralizar la quitina contenida en los desechos de camarón durante 1 h y en presencia de 50 mL de etanol para despigmentar la quitina. Finalmente, se emplea un arreglo electroquímico de dos electrodos en medio ácido para desacetilar la quitina y precipitarla con una solución de NaOH; Dicho proceso se describe en los siguientes pasos.

i) Proceso de desproteínización y desmineralización en solución ácida

En una preparación típica de solución, 4 g de cáscara de camarón se disuelven en 400 ml de solución de ácido acético en una concentración de 0.3 molL^{-1} . La mezcla se somete a calentamiento a una temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ y 200 rpm de agitación controlada por 1 h (figura 1.15). Posteriormente se recupera el sólido y se lava hasta alcanzar un pH neutro.



Figura 1.15. Cáscara de camarón en Ac. Acético 0.3 molL^{-1} .

ii) Proceso de despigmentación

Para obtener la quitina se realizó el proceso de despigmentación utilizando etanol como se describió en párrafos anteriores, obteniendo así la quitina para su análisis.

iii) Desacetilación de quitina mediante electrólisis forzada

Se prepara una solución de HCl con la quitina resultante en una proporción 1:5 y se somete a calentamiento a 55°C con agitación constante a 200 rpm por 1 h, con lo que se logra solubilizar toda la muestra. Luego, para conseguir la desprotonación del

quitosano, se titula con hidróxido de sodio en un sistema electroquímico de dos electrodos empleando titanio como ánodo y titanio recubierto con RuO_2 como cátodo, conectados a una fuente de corriente continua, imponiendo un potencial de celda de 30 V por un lapso de 30 minutos hasta alcanzar un $\text{pH} > 6$, con lo que se tiene la precipitación de quitosano (figura 1.16).

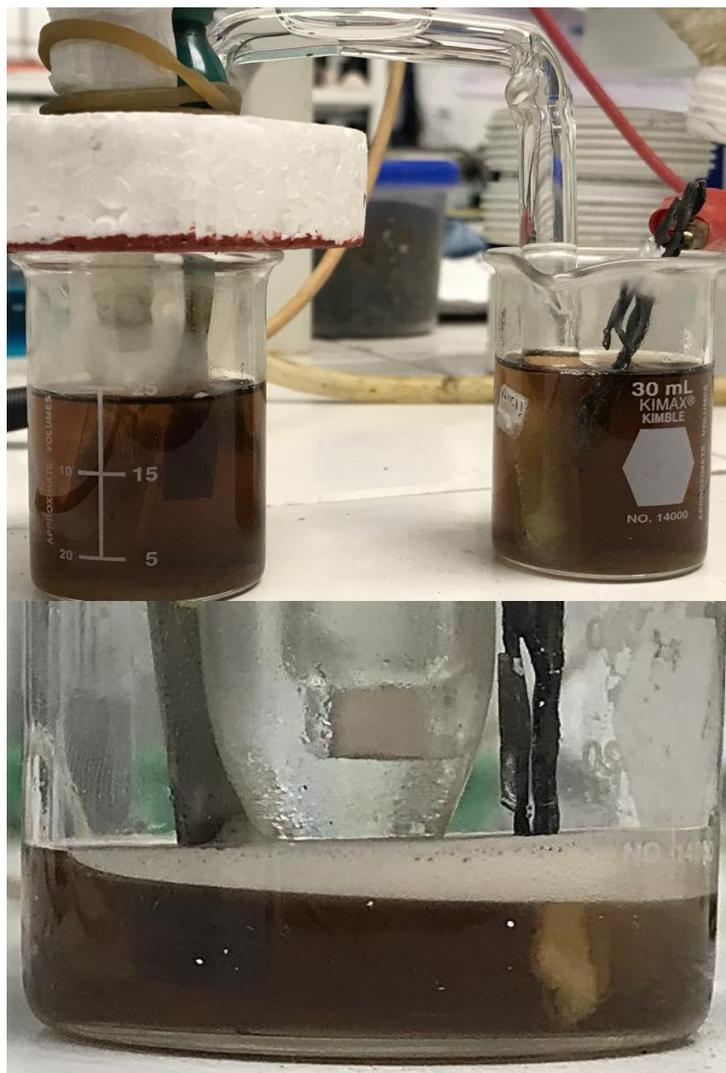


Figura 1.16. Arreglo electroquímico de desacetilación de quitina en medio HCl.

7.1.3.- METODO DE HÍDRÓLISIS ÁCIDA POR DEPÓSITO ELECTROQUÍMICO

Se realizó el proceso de obtención de quitosano directamente mediante la hidrólisis de la mayoría de las especies presentes en la cáscara de camarón, empleando ácido acético a la concentración de 0.3 molL^{-1} como agente digestivo. Esto se realiza a

temperatura ambiente y agitación constante de 200 rpm por un periodo de 1 h. Posteriormente, se eliminan las partículas sólidas de la solución mediante un filtrado. La solución resultante se utiliza como electrolito soporte en un arreglo electroquímico de dos electrodos en medio ácido, imponiendo potenciales de reducción de -1 a -1.5 V, para propiciar el depósito de una capa de quitosano.

Se realizó una caracterización del quitosano, evaluando la solubilidad mediante el método descrito en la norma ASTM D1110-56. Se obtuvo el peso molecular mediante el método viscosimétrico descrito bajo la norma ASTM D-2857. Finalmente, se realizó una caracterización mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).

7.2.- OBTENCIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO

El procedimiento de entrecruzamiento de quitosano se llevó a cabo mediante síntesis química convencional, mecanoquímica y electroquímica, en presencia de agentes químicos dicarbonílicos como glioxal y glutaraldehído.

7.2.1.- METODO DE ENTRECruzAMIENTO CONVENCIONAL QUÍMICO

La primera reacción de entrecruzamiento de la cadena de quitosano se realiza en presencia de un medio ácido para favorecer la formación de enlaces covalentes tipo imina, vía reacción de Schiff [93, 94, 95], en la cual la protonación debida al medio del grupo carbonilo aumenta la polaridad positiva del agente entrecruzante y favorece el ataque nucleófilo de la amina primaria del quitosano, obedeciendo los mecanismos de reacción planteados en las figuras 1.17 y 1.18.

Para esto, fue necesario preparar una solución de ácido acético al 3% m/v con agitación constante por, aproximadamente, 60 min. El entrecruzamiento de quitosano se realiza por inmersión en soluciones de agentes entrecruzantes (glioxal y glutaraldehído) evaluando diferentes concentraciones de estas al 20, 30 y 40%. Dejando reaccionar por 24 h; después del proceso de entrecruzamiento, se elimina por vaciado el agente entrecruzante del sistema y se agrega etanol por 10 min para eliminar el exceso del

reactivo del hidrogel, luego se elimina el etanol y se sustituye por glicina 0.1 molL^{-1} durante 5 min, para neutralizar los grupos aldehídos que no reaccionaron y por último se hacen lavados con agua destilada a esta solución y se secan a 55°C por 24 h.

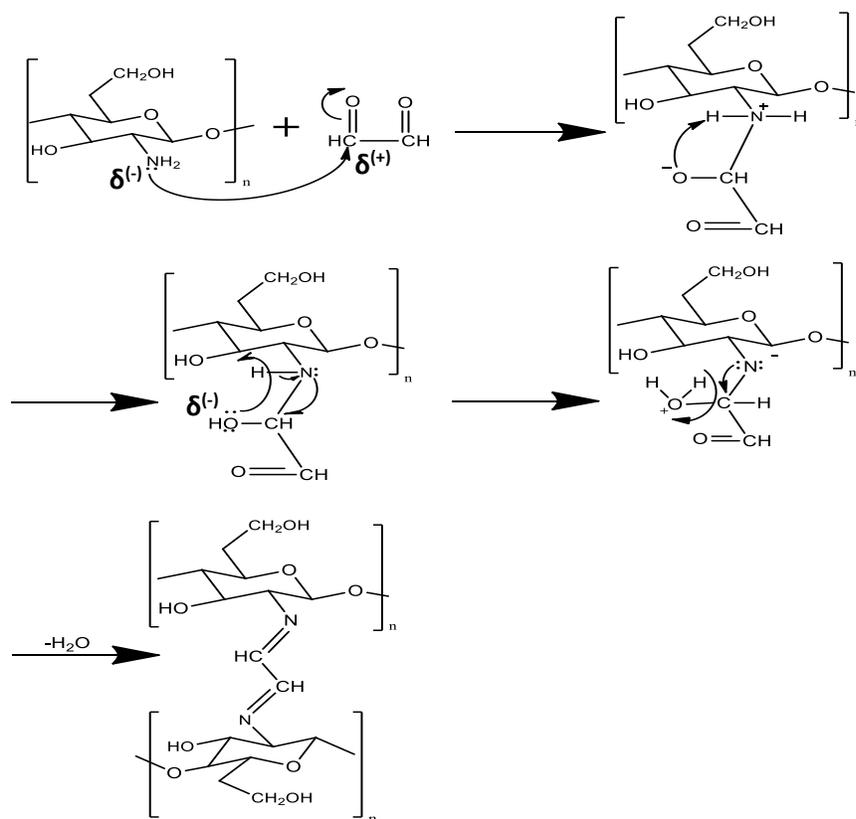


Figura 1.17. Mecanismo de Entrecruzamiento quitosano-glioxal

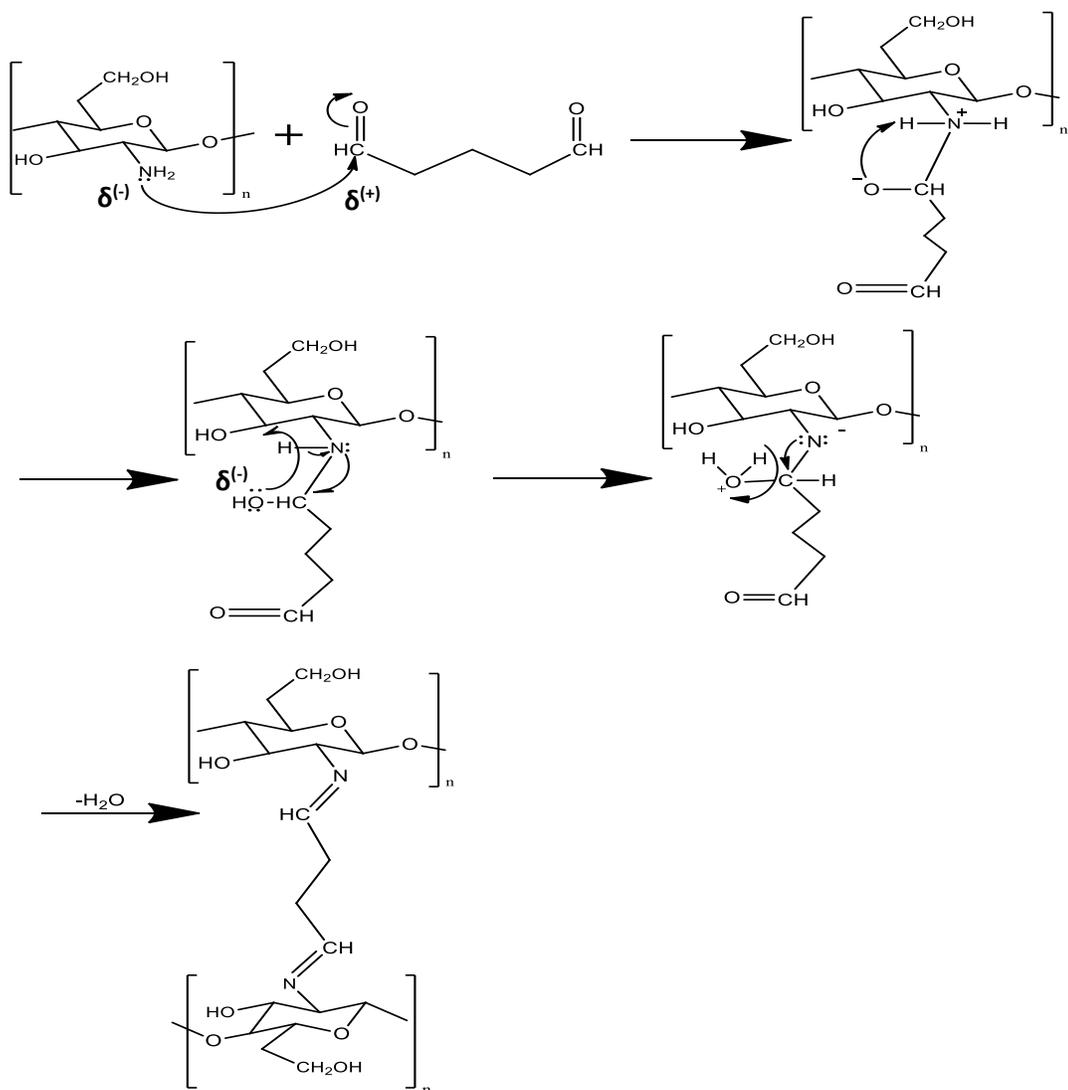


Figura 1.18. Mecanismo de entrecruzamiento quitosano-glutaraldehído.

7.2.2.- METODO DE ENTRECruzAMIENTO ELECTROQUÍMICO

De igual manera, se lleva a cabo el proceso de entrecruzamiento de quitosano mediante técnicas electroquímicas. Esto es posible debido a la naturaleza policatiónica del quitosano, que en presencia de un polianión puede gelificar teniendo en cuenta factores como:

- I. Concentración de quitosano.
- II. Fuerza iónica.
- III. pH.

IV. Potencial o corriente utilizada para controlar la velocidad de la reacción.

Con lo anterior se busca generar un polianión en presencia de un catión multivalente. Dicho proceso se realiza en un sistema de tres electrodos, en presencia de quitosano con agentes químicos dicarbonílicos como glioxal y metilglioxal, en concentraciones óptimas (según resultados del proceso entrecruzante químico y los datos obtenidos de la literatura) disueltos en un medio electrolítico que contenga ácido fórmico. Para dar seguimiento se emplea la técnica de voltamperometría cíclica (VC) en una ventana de potencial que fue obtenida mediante un estudio experimentalmente para este sistema. Los resultados proporcionaron información acerca de la reversibilidad de los procesos de transferencia electrónica, cantidad de electrones en transferencia dentro de la reacción óxido-reducción, constantes de velocidad de formación, así como parámetros de transferencia de masa en caso de que la reacción se viera afectada por ellos.

Se realizaron cronoamperometrías, utilizando el potencial óptimo del proceso, obtenido con la técnica de VC. Además, se emplea la técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica tomando en cuenta que la literatura reporta que la resistencia a la transferencia de carga es directamente proporcional a la cantidad de proteína adsorbida (concentración superficial) y que este proceso, depende en gran medida de la afinidad de la proteína a los sitios bioactivos en la superficie polimérica [96].

El depósito electroquímico se realiza en una celda electrolítica con un arreglo horizontal de dos electrodos, empleando como electrodo de trabajo una placa de Ti de 25 cm² y una malla de Ti-RuO₂ de 27.5 cm². El electrolito se prepara solubilizando el quitosano en ácido acético a 0.3 molL⁻¹ en una relación de 1% m/m generando una solución acuosa con un pH inferior a 6. Las condiciones para el depósito electroquímico se obtienen imponiendo una intensidad de corriente (*i*) de 400 mA durante un tiempo de 20 min.

El depósito obtenido fue entrecruzado por inmersión de la película generada en una solución de agente entrecruzante (GTA y GXL) de concentración variable de 20, 30 o

40 % durante un tiempo de 24 h. El depósito es purificado con etanol grado analítico durante 10 min, posteriormente el producto obtenido es separado del etanol y se introduce en una solución de glicina al 0.1 molL^{-1} por 5 min para neutralizar los aldehídos sin reaccionar. Finalmente, se eliminan solventes agregando agua desionizada a presión y después de un proceso de secado a 55°C por 24 h se obtiene una película de xerogel.

7.2.3.- MÉTODO DE ENTRECRUZAMIENTO POR MECANOSÍNTESIS

Para la obtención de hidrogeles por mecanosíntesis se emplea un molino de alta energía tipo vibratorio modelo SPEX8000D con dos contenedores (cada uno contiene 6 esferas de 1cm de diámetro) de acero inoxidable. La reacción se lleva a cabo agregando a un contenedor 0.10 g de quitosano y el agente entrecruzante (GTA y GXL) de concentración variable (20, 30 y 40 %) durante un tiempo de operación de 90 minutos. El producto obtenido es recuperado mediante lavados con etanol grado analítico, evaporándolo en horno a 60°C por 10 min. Posteriormente se introduce en glicina al 0.1 molL^{-1} durante cinco minutos, para neutralizar los aldehídos sin reaccionar. Se eliminan los solventes agregando agua desionizada y después de un proceso de secado a 55°C por 24 h se obtiene un producto final de xerogel.

7.3.- OBTENCIÓN DE QUITOSANO FUNCIONALIZADO

Se realiza la funcionalización de quitosano con compuestos carbonílicos como Piruvaldehído (figura 1.19) empleando un molino SPEX8000D en un contenedor de polietileno con 3 esferas plásticas de 1.2 cm de diámetro, en una relación de 1:9 w/w de quitosano y aldehído a una concentración de 40%, por un tiempo de molienda de 90 min. Posteriormente se lava con etanol y se seca en un horno a 60°C por 10 min, se lava nuevamente con agua desionizada hasta pH constante y se seca a 55°C por 24 h.

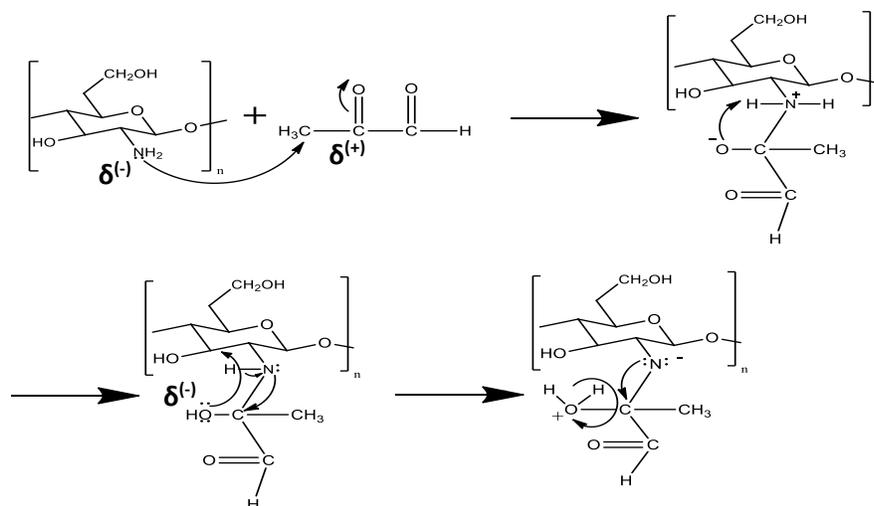


Figura 1.19. Mecanismo de funcionalización quitosano-metilgloxal.

De igual manera se obtiene un biopolímero a partir de la funcionalización de quitosano en presencia de compuestos quirales, cuyas especies estén disueltas en un medio electrolítico que contenga ácido acético, usando un sistema electroquímico de tres electrodos. Para dar seguimiento se emplea la técnica de voltamperometría cíclica (VC) imponiendo la ventana de potencial de barrido determinada previamente. Con el fin de generar un material con posibles aplicaciones como andamio para la regeneración de tejidos.

Los biomateriales resultantes fueron caracterizados. Los hidrogeles se consideran estructuras tridimensionales que tienden a hincharse en presencia de agua o fluidos biológicos, por lo que para comprobar la influencia del método de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas; así como, la influencia del tipo y concentración de agente entrecruzante, se evalúa el peso del xerogel y el peso del hidrogel hidratado a un tiempo determinado.

Adicionalmente, se evalúa el efecto de la funcionalización en la solubilidad del producto. Se estudian, de igual manera, los productos por técnicas espectroscópicas como, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) necesaria para conocer la estructura química. También, se realizan pruebas de solubilidad de los biopolímeros.

Para evaluar las propiedades biomecánicas de los biomateriales bajo esfuerzo de corte se utiliza un reómetro; para los ensayos de tracción, se emplea un sistema electromecánico, usando los hidrogeles obtenidos. La preparación de las muestras es la misma en ambos casos.

VIII.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1.- CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO Y QUITINA

Con el fin de encontrar un proceso óptimo de conversión de quitina procedente de exoesqueletos de crustáceos en quitosano, se realizó un análisis comparativo del método industrial propuesto por la literatura y métodos propuestos por el equipo de trabajo con el fin de generar un mayor rendimiento en la conversión de dichas especies, disminuir el consumo energético y de reactivos involucrados en dicho proceso. Por tal motivo se le dio un seguimiento analítico a cada uno de los procesos aquí planteados.

Cabe destacar que la metodología debe ser llevada a cabo bajo condiciones controladas con el fin de garantizar un producto con características deseables como peso molecular, coloración y grado de desacetilación.

(i) Método químico heterogéneo.

Factores que fueron considerados en la reacción de producción de quitosano son:

- a) Temperatura y tiempo de reacción;
- b) La concentración de la solución alcalina y la calidad del solvente
- c) Relación estequiométrica quitina /NaOH
- d) Tamaño de las partículas de quitina
- e) La atmósfera de reacción (la presencia de oxígeno durante la desacetilación influye en la degradación del polisacárido y disminuye la viscosidad y el peso molecular de los productos [97])

(ii) Método de electrólisis forzada.

Se logró proponer un sistema electroquímico con el fin de generar condiciones óptimas de obtención de quitosano a partir de exoesqueletos de artrópodos, esta necesidad sustentada, principalmente en los altos requerimientos energéticos del método convencional (*químico*), asociados indirectamente a la reacción exotérmica derivada a

la alta concentración de NaOH y los requerimientos de grupos OH necesarios para el proceso de desacetilación.

Debido a esto se propuso un sistema electroquímico evaluando un arreglo simple de dos electrodos empleando una placa de titanio como ánodo con una área geométrica aproximada de 6 cm^2 y una malla de Ti-RuO₂ como cátodo, ambos electrodos fueron limpiados previamente por abrasión física con una lija número 360 y 1500, y por inmersión química en una solución de acetona a baño ultrasónico por un lapso de 5 min; posteriormente se conectaron a una fuente a potencial variable en una solución de HCl al 0.74% v/v.

(iii) Método de hidrólisis ácida por electrodeposición.

Este sistema consta de un arreglo de 3 electrodos que consiste en una placa de titanio como electrodo de trabajo, una malla de Ti-RuO₂ como contra electrodo y un electrodo de calomel como referencia; inmersos en un electrolito soporte de ácido acético al 0.3N donde previamente por inmersión de partículas de cáscara de camarón se hidrolizó la quitina presente a temperatura ambiente y agitación constante a 200 rpm por 1 hora imponiendo potenciales de reducción de -1 a -1.5V.

Los procesos realizados se esquematizan en la figura 1.20.

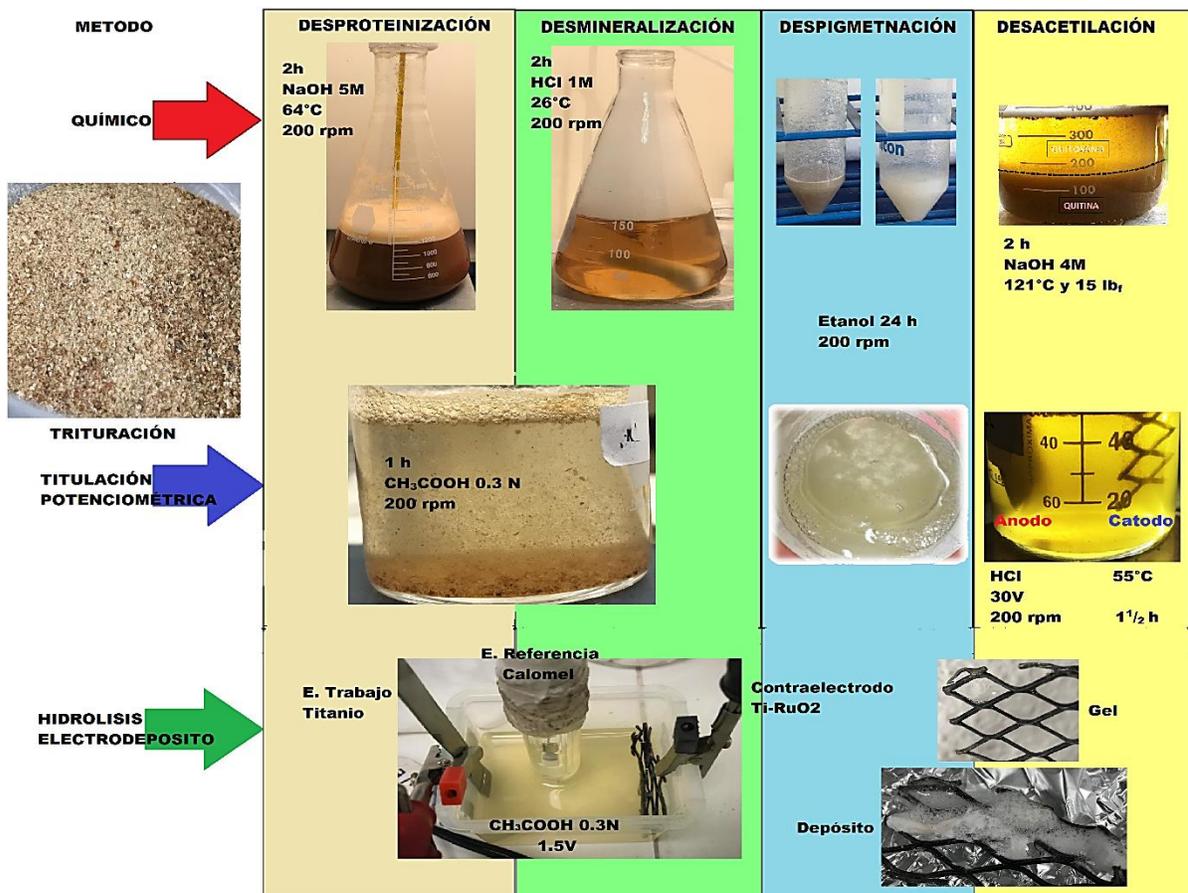


Figura 1.20. Esquematación de los procesos de obtención de quitosano, Método Químico – Método Electroquímico.

8.1.1- TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

Se realizó el seguimiento del proceso mediante técnicas electroquímicas con el fin de elucidar condiciones óptimas para el proceso, las cuales se describen en cada caso.

8.1.1.1.- TÉCNICAS POTENCIODINAMICAS (VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA)

Los estudios electroquímicos se realizaron empleando la técnica de voltamperometría cíclica, los cuales fueron realizados con las condiciones descritas anteriormente (Figura 1.21).



Figura 1.21. Esquematización del Sistema electroquímico con un arreglo de 3 electrodos; (rojo) E.T, (Negro) C.E. (Blanco) Referencia.

Los estudios realizados para la VC fueron hechos en una ventana de potencial de 4 a -4V partiendo de un potencial de corriente nula; realizando un barrido tanto hacia sentido anódico como hacia sentido catódico, a una velocidad de barrido de 0.025V/s. El número de ciclos fue determinado según la variabilidad de cada estudio.

En el primer caso se realizaron VC empleando únicamente el electrolito soporte de Ácido Acético al 0.3 molL^{-1} efectuando los barridos en dirección anódica y catódica con un número de 10 ciclos.

En la figura 1.22 se muestra el voltamperograma de 10 ciclos en un sistema sin la presencia de especies hidrolizadas de camarón, con una ventana de potencial de +4 a -4V, comenzando el barrido en dirección anódica partiendo de potencial de corriente nula.

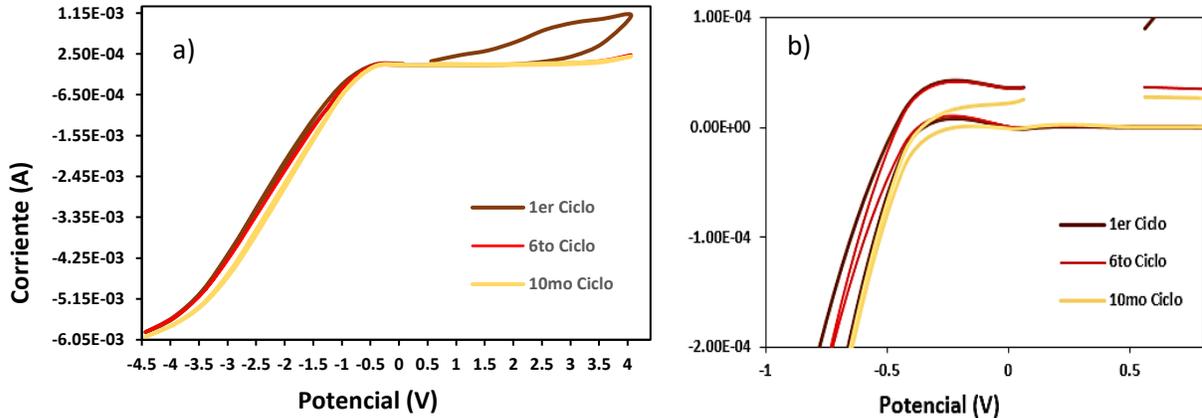


Figura 1.22. Voltamperograma cíclico de ácido acético 0.3 molL^{-1} a pH 4 sin especies hidrolizadas de camarón en una ventana de potencial de +4V a -4V, a 25 mVs^{-1} durante 10 ciclos (a), Aumento de resolución en inicio de cada ciclo (b) .

Se observa que en el sentido anódico para el primer ciclo existe un incremento en la intensidad de corriente de oxidación en aproximadamente 2.5V el cual continua hasta 4V alcanzando una intensidad de corriente de $1.1 \times 10^{-3} \text{ A}$ y al momento de invertir el sentido del barrido de potencial al sentido catódico forma una especie meseta, con una abertura de aproximadamente 0.8mA y un pico máximo a 1.1mA, lo cual es atribuido a la oxidación de especies presentes en el medio electrolítico, así como el comienzo de la formación de la capa pasiva de TiO_2 sobre la superficie del sustrato de Ti.

La formación de la capa de TiO_2 se corrobora en cada incremento de ciclo donde la reacción de evolución de oxígeno disminuye drásticamente lo cual se debe al incremento en el paso de corriente por la superficie pasivada de titanio, esto se elucida en el diagrama de pourbaix que se muestra en la figura 1.23. Donde, la aparición del ion acetato (CH_3COO^-) ocurre a pH mayores a 5 independientemente al potencial impuesto.

En cuanto al sentido catódico se observan a partir de potenciales de 1.5 a -0.2V los procesos reductivos de iones acetatos provenientes de la previa oxidación; así como el cambio de pendiente en aproximadamente -0.35V debido al inicio de evolución de hidrógeno, lo cual se debe a la alta cantidad de energía impuesta.

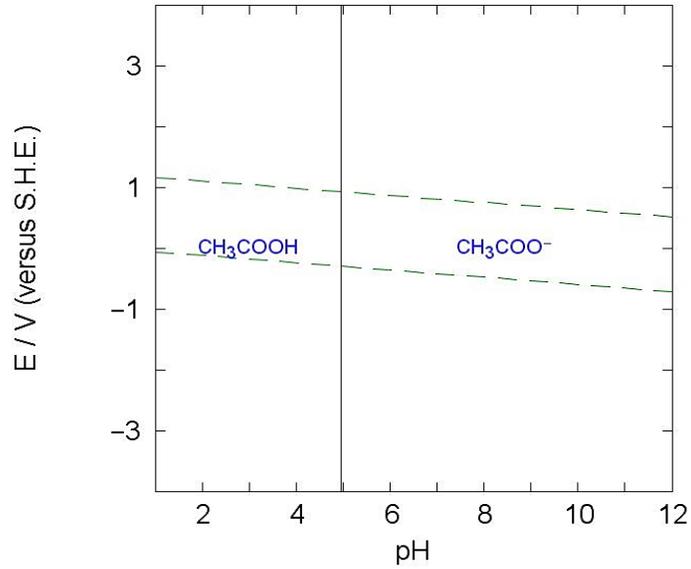


Figura 1.23. Diagrama de zonas de predominio del ion acetato 0.3 molL^{-1} .

En la figura 1.24 se muestran los voltamperogramas de 10 ciclos en un sistema sin la presencia de especies hidrolizadas de camarón, con una ventana de potencial de -4 a +4V, comenzando el barrido en dirección catódica hacia -4V partiendo del potencial de corriente nula.

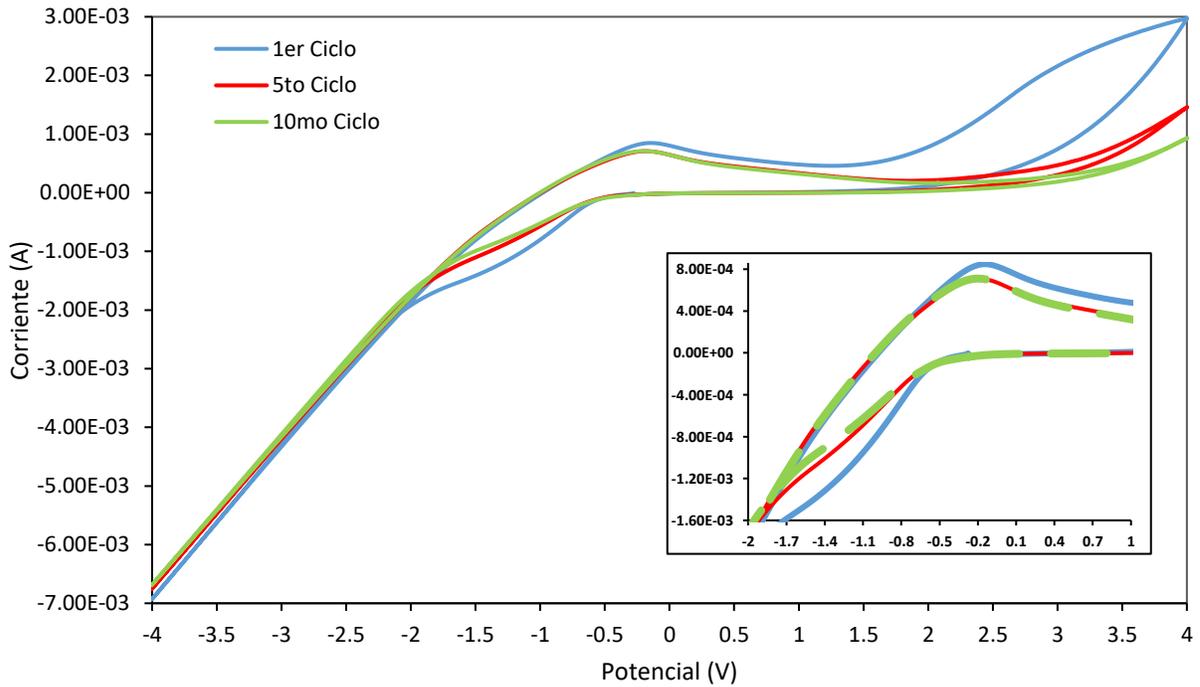


Figura 1.24. Voltamperograma cíclico para ácido acético 0.3 molL^{-1} a pH 4 en sentido catódico de +4V a -4V, utilizando una velocidad de barrido 100 mVs^{-1} durante 10 ciclos.

En este caso se observa que, para el primer ciclo el potencial a una corriente cero se ubica en aproximadamente -0.28 V y posteriormente se puede apreciar una meseta en la pendiente de la corriente farádica del barrido catódico en aproximadamente -0.57 y -1.93 V alcanzando una intensidad de corriente de -1.7×10^{-3} A, la cual puede ser atribuida a la reducción de la especie acetato, seguido por la evolución de hidrógeno hasta el potencial de -4 V logrando alcanzar una intensidad de corriente de -6.7×10^{-3} A. En cuanto al sentido anódico, el proceso de reducción de acetato se revierte al momento de aparecer una meseta en la pendiente farádica del barrido anódico entre los potenciales de -0.53 y 0.17 V con una intensidad de corriente de pico de 8.4×10^{-4} A.

Posteriormente en potenciales hasta 1.73 V y con una intensidad de corriente de 5.8×10^{-4} A, se observa la pasivación del metal de Ti (aparición de la capa pasiva de TiO_2), seguida de la evolución de oxígeno que incrementa hasta una intensidad de corriente de 2.9×10^{-3} A en el potencial de 4 V y que, al momento de regresar al potencial de corriente nula, forma una especie de hombro de la misma manera que en la fig.1.22, lo que, como se discutió previamente, se debe a la pasivación del sustrato. En los posteriores ciclos se percibe de manera menos marcada la reducción del ion acetato por lo que la evolución de H_2 se presenta a valores menos energéticos de -1.67 y -1.82 V para 6 y 10 ciclos respectivamente. El proceso de reversibilidad se muestra entre los potenciales de -0.63 y -0.12 V, seguido por la pasivación metálica del sustrato hasta llegar a la mínima evolución de oxígeno; con intensidades de corriente de 1.4×10^{-3} y 9.25×10^{-4} A para 6 y 10 ciclos, respectivamente.

Con ello es posible determinar los procesos oxidativos y reductivos que suceden en el electrodo de Ti con el electrolito soporte controlando el sentido de inducción del potencial, previo al proceso con especies hidrolizadas provenientes de la cáscara de camarón.

Con el fin de evaluar los procesos que se encuentran en las especies se realizaron VC empleando el electrolito soporte evaluado previamente, pero ahora en presencia de cáscara de camarón hidrolizada efectuando el análisis mediante barridos en dirección anódica y catódica, con 10 ciclos.

Para la evaluación del medio hacia sentido anódico (figura 1.25) se puede visualizar un desplazamiento de la evolución de oxígeno a potenciales más bajos de alrededor de 0.2V; atribuyendo a la presencia de la cáscara de camarón el aumento de la resistividad del medio, alcanzando una máxima corriente hacia oxidación con valor de $8 \times 10^{-4} \text{A}$ y disminuyendo la corriente conforme se completa cada ciclo. Hacia potenciales de reducción se puede identificar un punto de cruce a un potencial alrededor de -1V. Dicho cruce se asocia a los procesos de nucleación y formación de nuevas fases electroquímicas, en el cual se considera la condición inicial para llevar a cabo el depósito de una especie entre valores límites de la reducción y oxidación. Adicionalmente a este proceso la evolución de hidrógeno se ve desplazada a potenciales más energéticos de -0.8V, donde la intensidad de corriente aumenta con cada ciclo.

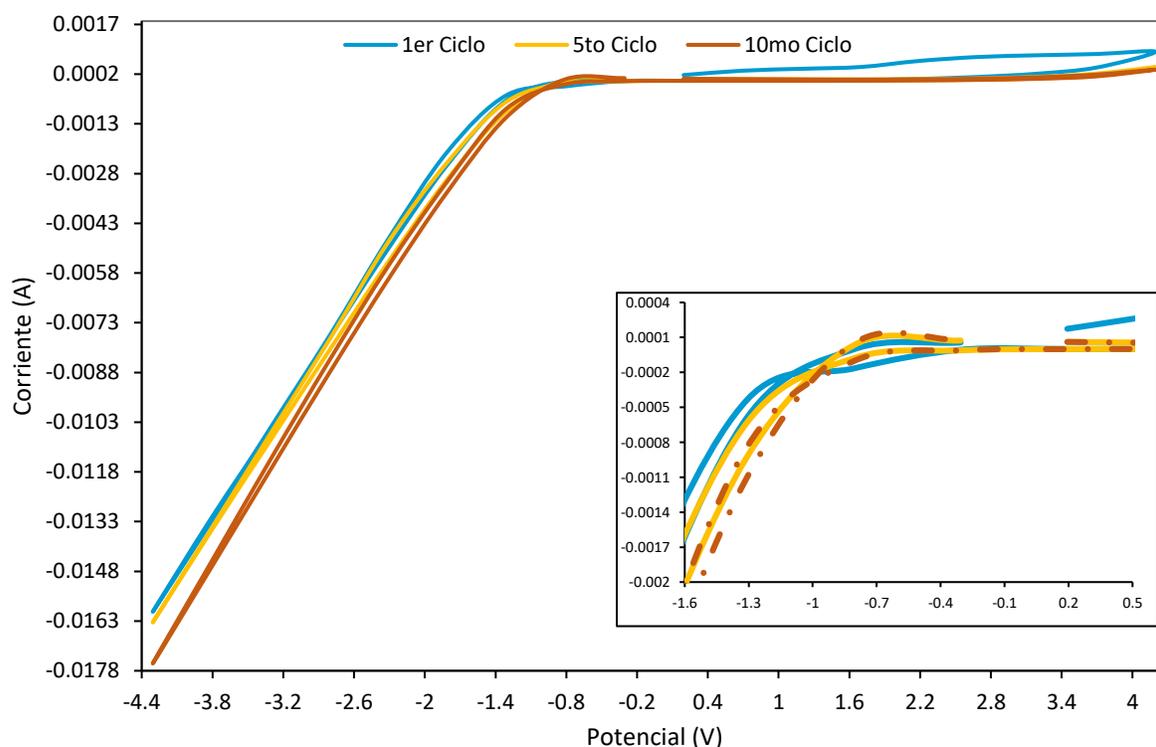


Figura 1.25. Voltamperograma cíclico de ácido acético - cáscara de camarón a pH 4 en sentido anódico de +4V a -4V, velocidad de barrido 25mVs^{-1} , 10 ciclos.

Para la evaluación del medio hacia sentido catódico (figura 1.26) se observa para el primer ciclo el potencial a una corriente cero se ubica en aproximadamente -0.31 V y posteriormente se puede apreciar una meseta en la pendiente de la corriente farádica catódica en aproximadamente -0.35 y -1.5 V alcanzando una intensidad de corriente

de $-1.2 \times 10^{-3} \text{A}$, atribuida a la reducción de la especie acetato, traslapado con un proceso a un potencial hacia reducción de -0.5V ; alcanzando corrientes máximas de $-2 \times 10^{-4} \text{A}$, que se aprecian simultáneamente a la evolución de H_2 hasta el potencial de -4V , logrando alcanzar una intensidad de corriente en el primer ciclo de $-1.6 \times 10^{-2} \text{A}$ y disminuyendo con cada ciclo.

En cuanto al punto de nucleación, se ve desplazado a potenciales de -1.5V y el proceso reversible de la reacción de acético-acetato se ve desplazado, mostrando la meseta en la pendiente farádica anódica entre los potenciales de -0.24 y -1.55V con una intensidad de corriente de pico de $1 \times 10^{-3} \text{A}$. Posteriormente hacia potenciales más positivos a -0.4V , se observa la pasivación del metal de Ti con una intensidad de corriente de $2.4 \times 10^{-3} \text{A}$ (aparición de la capa pasiva de TiO_2) que se ve prolongada debido a las especies debidas a la hidrólisis del camarón, traslapada con la evolución de oxígeno, que se incrementa hasta una intensidad de corriente de $2.4 \times 10^{-3} \text{A}$ en el potencial de 3.9V y que al momento de regresar al potencial de corriente nula, forma una especie de abertura en forma de hombro, de la misma manera que en la fig.1.26, lo que como se discutió previamente se debe a la pasivación del sustrato. En los posteriores ciclos se percibe de manera menos marcada la reducción del ion acetato por lo que la evolución de H_2 se presenta a valores menos energéticos.

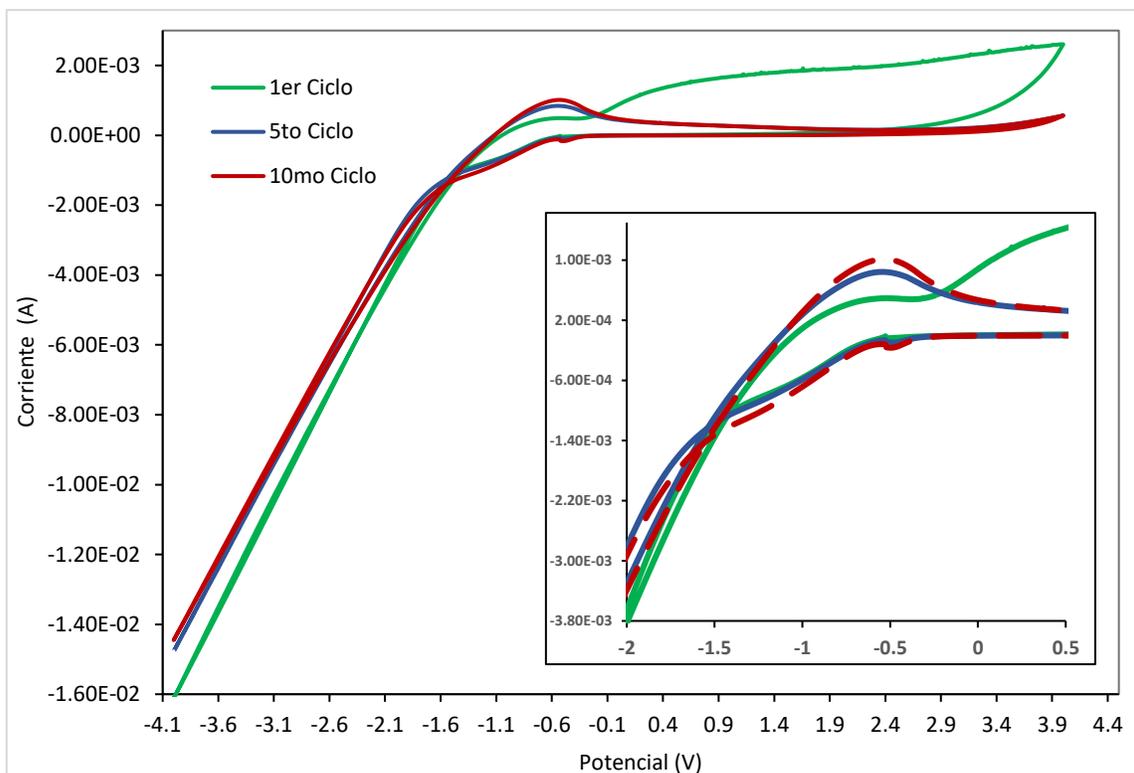


Figura 1.26. Voltamperograma cíclico de ac. acético - cáscara de camarón a pH 4 sentido catódico de -4V a +4V, velocidad de barrido 100mVs^{-1} , 10 ciclos.

Adicional a este estudio y con el fin de separar la reacción de oxidación de la evolución de oxígeno y la reacción de reducción de la evolución de hidrógeno, se realizó un análisis partiendo del potencial a circuito abierto (OCP) hacia -3 y +3 V en dos sistemas por separado donde en la figura (1.27 a.) se presenta VC en sentido catódico presenciando el punto de nucleación a potenciales de -1.15 V y donde se puede visualizar una disminución de la corriente capacitiva con cada ciclo acortando la corriente máxima en la evolución de hidrógeno del proceso, a diferencia de los procesos anódicos (figura 1.27 b.).

En el primer ciclo se puede observar que la evolución de oxígeno ocurre a potenciales de alrededor de 0.3V y se puede visualizar la pasivación del electrodo de trabajo (Ti) a un potencial de alrededor de 1.9V con una pérdida abrupta de la corriente a potenciales de 2.9V donde se logró alcanzar corrientes de oxidación máximas de $6.2 \times 10^{-4}\text{A}$, con lo que la pasivación afectó las corrientes máximas de los ciclos

subsecuentes por la capa más estable de TiO₂ formada en el área activa del electrodo logrando alcanzar únicamente corrientes de alrededor de 1×10^{-4} A.

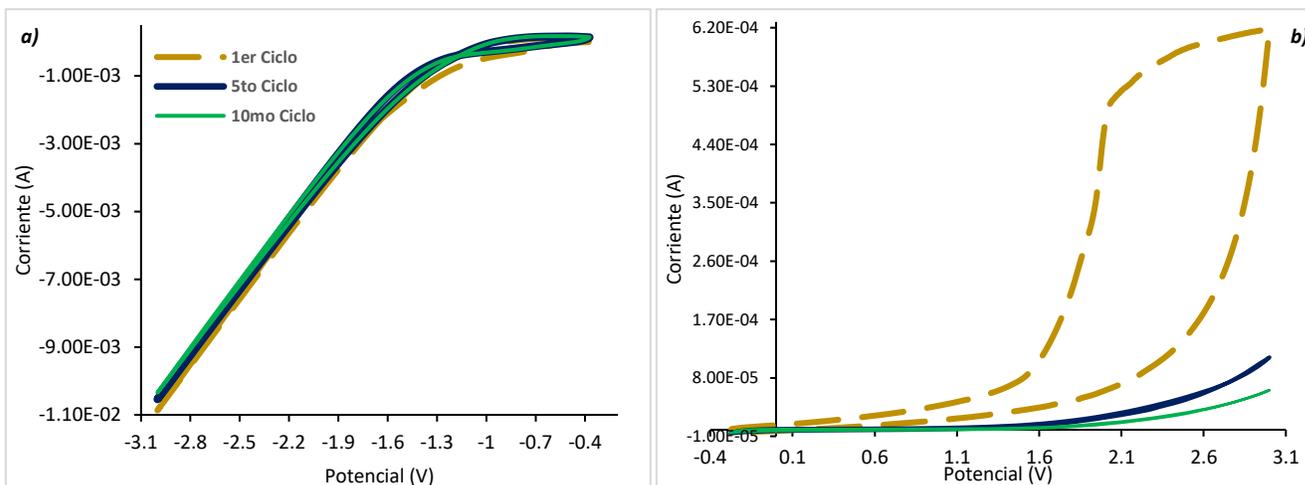


Figura 1.27. Voltamperograma cíclico de ácido acético - cáscara de camarón a pH 4; a) sentido catódico de OCP a -3V, b) sentido anódico de OCP a +3V; velocidad de barrido 25 mVs^{-1} , 10 ciclos.

8.1.1.2.- TECNICA POTENCIODINAMICA POR CRONOPOTENCIOMETRIA.

De igual manera se realizó el seguimiento del proceso de depósito de quitosano en la superficie del cátodo mediante una cronopotenciometría, este proceso se llevó a cabo con la imposición de corriente de 1 A hacia reducción, empleando el sistema propuesto por la metodología para tal efecto (figura 1.28).

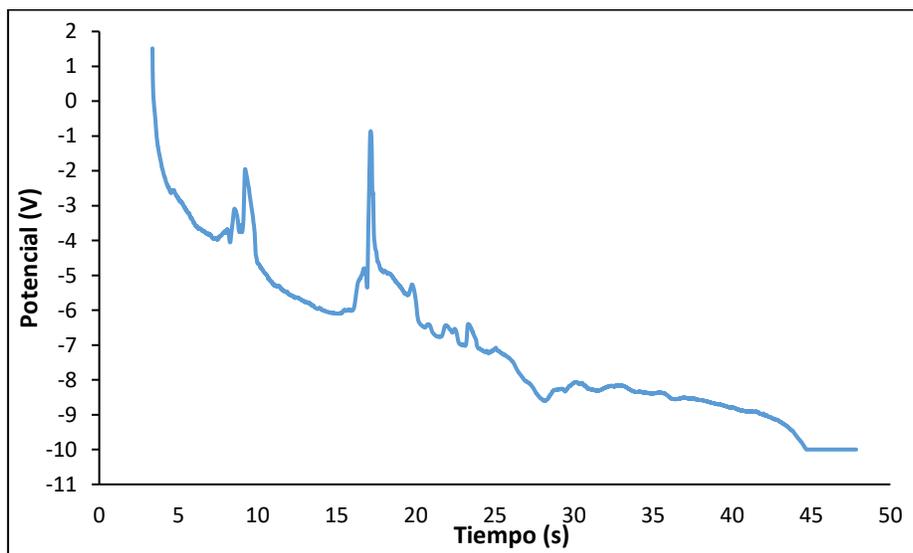


Figura 1.28. Cronopotenciometría de ácido acético - cáscara de camarón en sentido catódico imponiendo una corriente de 1 A.

En la figura 1.28 se evidencia la alteración del potencial a medida que el depósito se va acumulando, esto va aumentando la resistencia de la superficie del cátodo hasta un tiempo de 45 segundos en donde la superficie logra pasivarse por completo, lo cual se debe a que la superficie del cátodo fue cubierta en su totalidad por el quitosano, como resultado del proceso (figura 1.29).

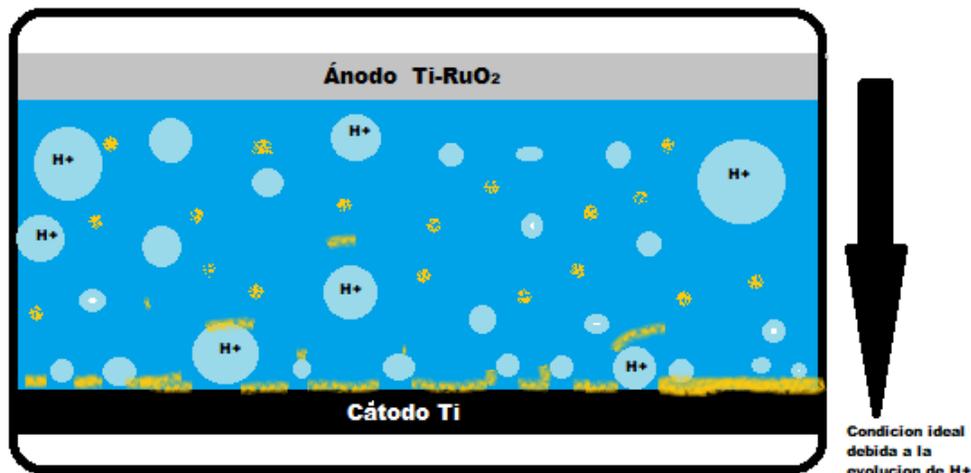


Figura 1.29. Representación de la reacción de desacetilación y su correlación con la evolución de H⁺.

8.1.2- MICROSCOPIA

Los productos obtenidos en cada etapa del proceso se analizaron mediante el uso de un microscopio óptico, estudiando la superficie de la muestra para corroborar visualmente la distribución de las fases en el material, dicho microanálisis se efectúa a 10X (imagen aumentada 10 veces) por medio de luz transmitida sobre la muestra.

Adicionalmente fueron debidamente caracterizados, por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Empleando para tal efecto un Microscopio Electrónico de Barrido marca JEOL modelo JSM-6300, aplicando para el análisis de morfología las siguientes condiciones de uso:

- Voltaje de aceleración $E_0 = 30$ keV.
- Corriente de la condensadora = $9 [1 \times 10^{-9} \text{ \AA}]$
- Modo de imagen en SEI (Electrones Secundarios)
- Distancia de trabajo (WD) = 15mm.
- Apertura = 3 (600 μm)

La preparación de las probetas consistió en montar sobre cita adhesiva de doble cara de grafito, sobre un porta muestras de cobre cilíndrico, una muestra representativa y con un recubrimiento de oro mediante un sputtering por 3 minutos.

(i) Método químico heterogéneo.

En la figura 1.30 se muestran los resultados del estudio realizado por microscopía electrónica de barrido, donde se pueden observar las muestras de quitina obtenidas por el método de desproteización, desmineralización y despigmentación química a las que se sometió la cáscara de camarón. En la figura 1.30 se logró identificar una estructura tipo escama, lisa, que forma polígonos irregulares de alrededor de 150 a 200 μm de diámetro, que se logran asimilar a la estructura de la cáscara de camarón. También, se puede visualizar mediante 10 aumentos la degradación del pigmento parcialmente debido al ataque químico con etanol. Esto se atribuye a que cada escama se compone de un apilamiento longitudinal de capas (visibles a 100 aumentos) y que a su vez entre capas se unen mediante una estructura fibrosa ordenada de aproximadamente 0.5 μm de espesor (visibles a 9,000 aumentos), limitando el área de contacto con el solvente (Figura 1.30).

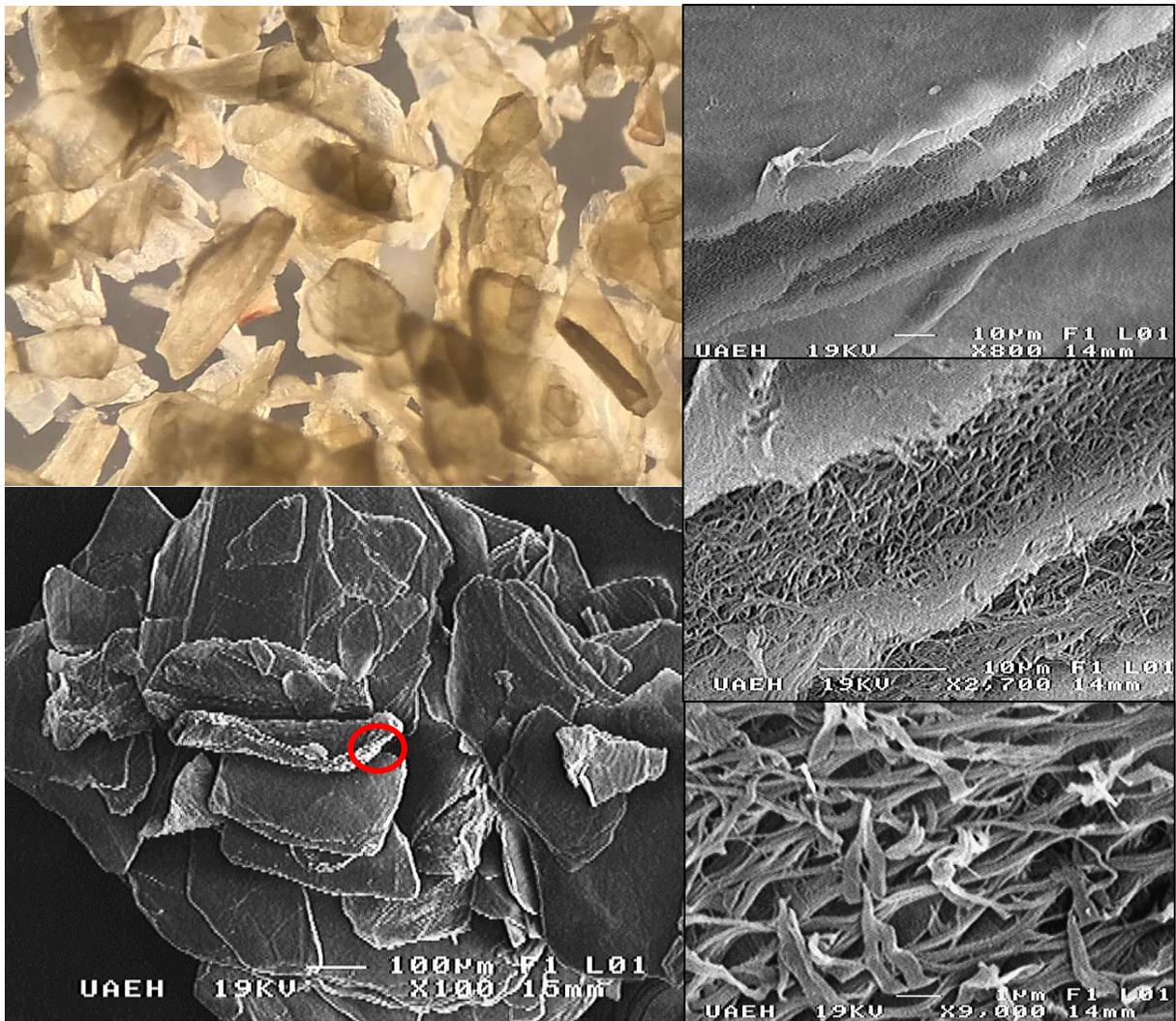


Figura 1.30. Microscopía óptica (10X) y MEB realizada a quitina obtenida por método químico a 100, 800, 2700 y 9,000 aumentos.

En la figura 1.31 se presentan las micrografías resultado de la caracterización realizada a las muestras de quitosano obtenidas del proceso de desacetilación química heterogénea, donde se pudo identificar una estructura totalmente diferente representada por partículas granulares (cuasi-esféricas) aglomeradas distinguiéndose formas de surcos a 4000 aumentos. Esto es atribuido al proceso de desacetilización del polímero (Figura 1.31). Cabe resaltar que la estructura es forzada a modificarse perdiendo su ordenamiento, debido al ataque químico concentrado con álcali y a la asociación de los procesos exotérmicos a los que se somete la quitina.

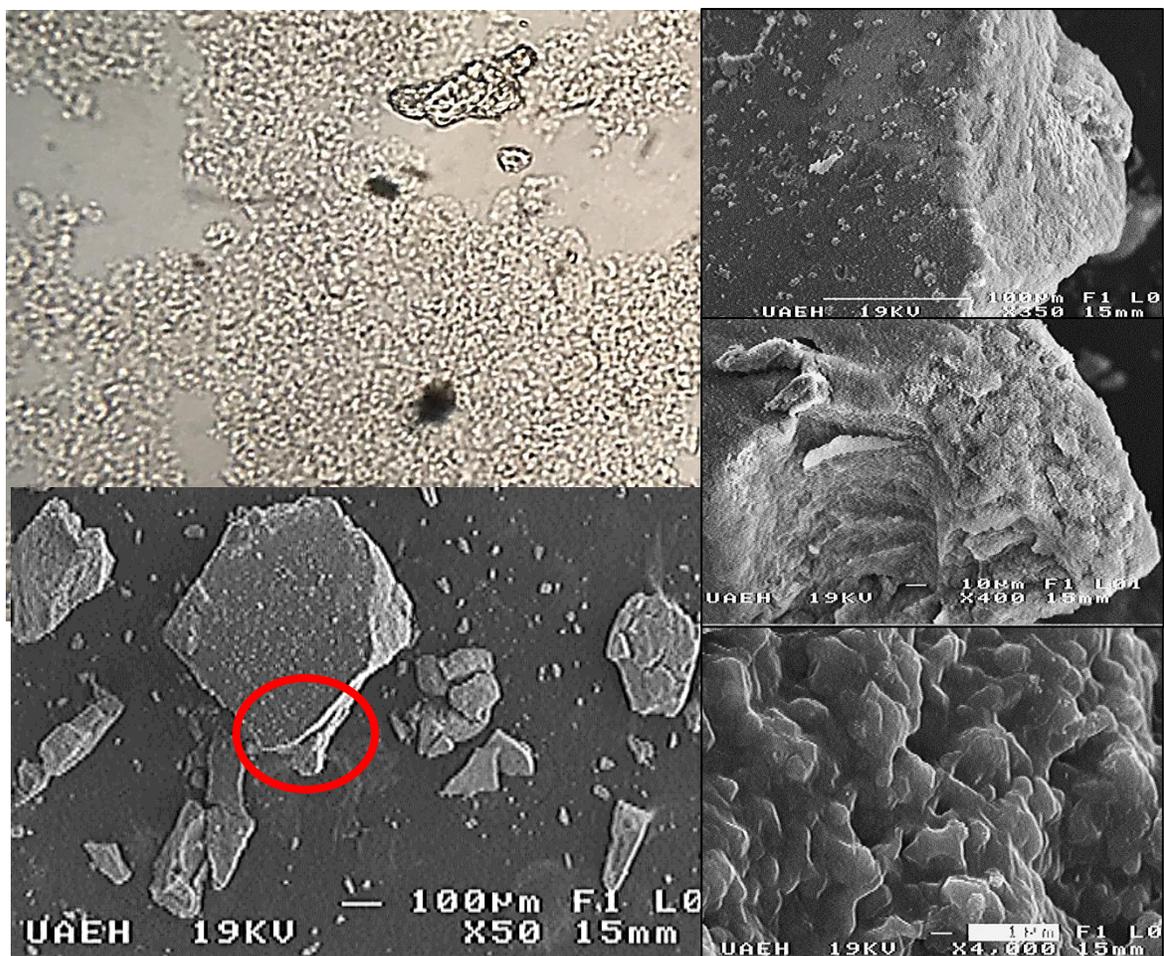


Figura 1.31. Microscopía óptica (10X) y MEB de estructura de quitosano obtenido por método químico a 50, 350, 400 y 4,000 aumentos.

8.1.3- ESPECTROSCOPIA INFRARROJO

Con el fin de elucidar la composición química de las especies resultantes, se realizaron los análisis de los espectros infrarrojos (FTIR) de la cáscara de camarón, quitina y quitosano respectivo para cada método de obtención.

(i) Método químico heterogéneo.

El resultado del proceso de obtención de quitosano mediante el método químico heterogéneo se presenta en la figura 1.32, donde se puede visualizar 3 espectros en un intervalo de frecuencia de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ en la forma de transmitancia vs. longitud de onda. Las bandas de absorción observadas son generalmente grandes debido al carácter macromolecular del compuesto y debido a las numerosas uniones

intermoleculares de hidrógeno, que se manifiestan incluso en el estado sólido de la muestra.

En todos los espectros infrarrojos se pueden observar las bandas típicas del quitosano a 3290cm^{-1} y 3285cm^{-1} determinadas por estiramientos simétricos -OH y superpuestas sobre estiramientos simétricos -NH. Así como la aparición del grupo -NH₂ a 3215cm^{-1} , dichas bandas definiéndose en los espectros del quitosano, debido al proceso de desacetilación asociado al segundo pico de identificación de la amina primaria (R-NH₂), corroborado con la disminución del grupo carbonilo (C=O) que aparece a 1664cm^{-1} acompañado de la frecuencia de torsión -NH₂ correspondiente a la quitina a 1574cm^{-1} .

También se aprecian las bandas de estiramiento C-H en el intervalo de 2800cm^{-1} a 3000cm^{-1} debido al proceso de desacetilación, las bandas 1372cm^{-1} y 1375cm^{-1} son determinadas por grupos (-CH₃), las bandas del grupo piranósico a 1077cm^{-1} y estiramientos simétricos C-O a 1074cm^{-1} , el estiramiento C-O-C glucosídico se ve a las frecuencias 705 y 556cm^{-1} .

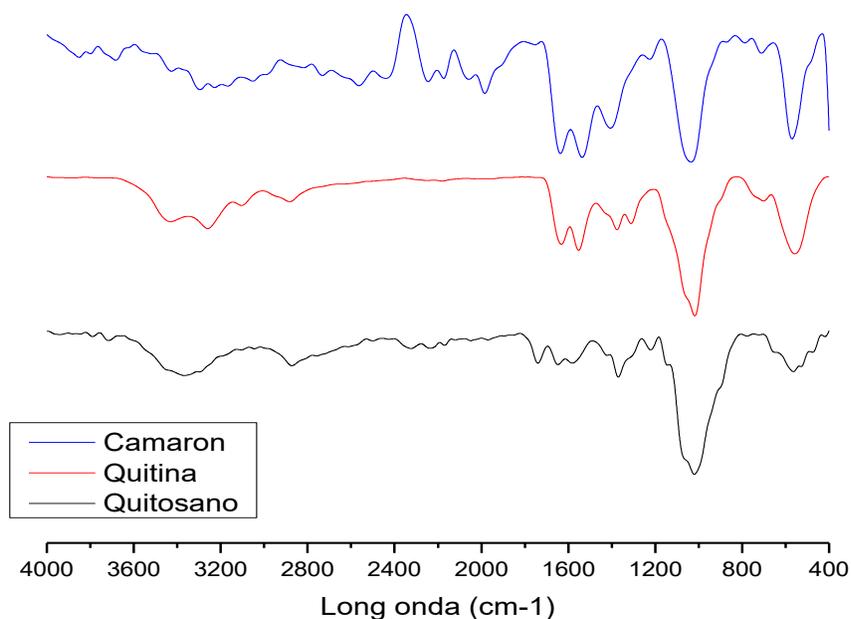


Figura 1.32. Espectro Infrarrojo de las especies resultantes del proceso de síntesis de quitosano por método químico (Cáscara de camarón(azul) –quitina(rojo) –quitosano(negro)).

(ii) Método electrólisis forzada.

Por otro lado, para el proceso electroquímico, en la figura 1.33 se presentan de igual manera los espectros infrarrojos comparativos de cada etapa del proceso, donde se pueden observar las bandas típicas del quitosano a 3290cm^{-1} y 3285cm^{-1} determinadas por estiramientos simétricos -OH y superpuestas sobre estiramientos simétricos -NH, a 3215cm^{-1} , dichas bandas se superponen en una sola en los espectros del quitosano, debido al proceso de desacetilación, en contra parte se corrobora la desacetilación con la disminución del grupo carbonilo (C=O) que aparece a 1664cm^{-1} acompañado de la frecuencia de torsión -NH₂ correspondiente a la quitina a 1574cm^{-1} .

Las bandas del grupo piranósico a 1077cm^{-1} y estiramientos simétricos C-O a 1074cm^{-1} , el estiramiento C-O-C glucosídico se ven a las frecuencias 705 y 556cm^{-1} , donde, se puede distinguir un mal proceso de desproteínización debido a la semejanza entre los espectros de quitina y cáscara de camarón.

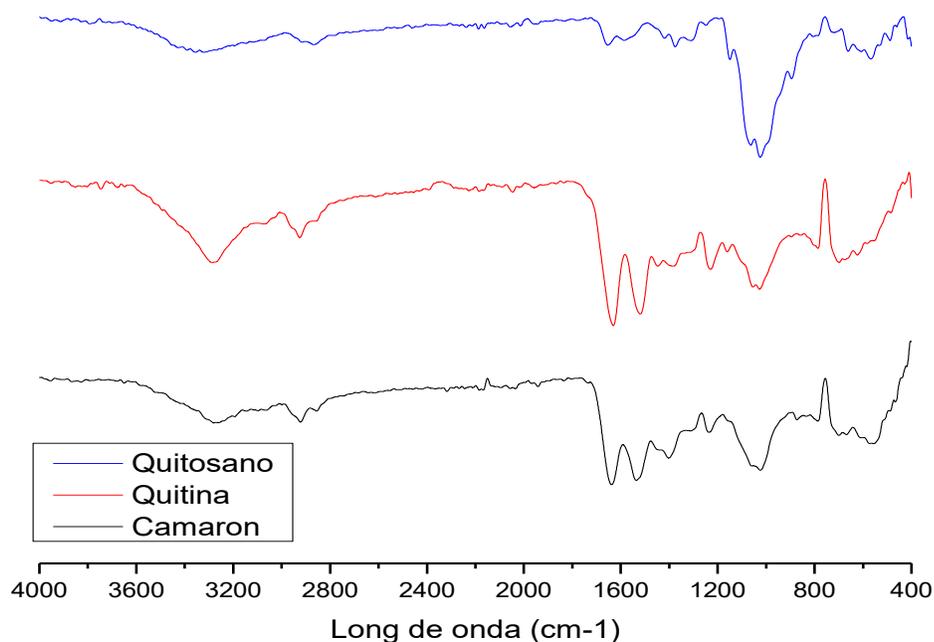


Figura 1.33. Espectro Infrarrojo realizado a los productos de la síntesis de quitosano por método de electrólisis forzada (Cáscara de camarón (negro) –quitina (rojo) –quitosano (azul)).

(iii) Método de hidrólisis ácida con electrodeposición.

En este sistema se caracterizó el depósito sólido obtenido en la solución con el fin de encontrar si la especie precipitada se trataba de quitosano, al identificar las bandas del espectro infrarrojo (figura 1.34) se puede apreciar una banda muy cercana a 2920 cm^{-1} , atribuida a la vibración tensión del C-H; las características más importantes en este espectro es la atribución de los picos localizados en la región de 1650 y 1540 cm^{-1} que corresponden a las bandas de amida I y amida II respectivamente que se pueden deber al proceso de desacetilación o la generación de depósitos asociados a las proteínas presentes en la materia prima, mientras que la banda ubicada cerca de 1380 cm^{-1} corresponde a la deformación simétrica de los grupos CH_3 y la ubicada en 1052 cm^{-1} representa el enlace débil C-N y banda C-O. El estiramiento C-O-C glucosídico se ve a las frecuencias 705 y 556 cm^{-1} .

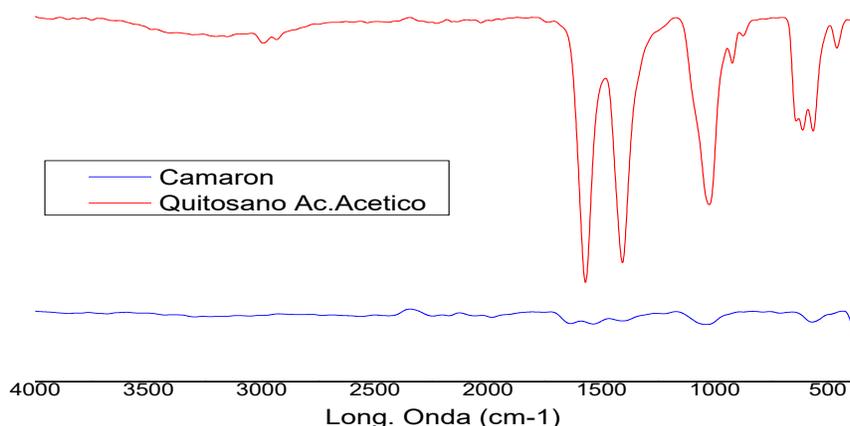


Figura 1.34. Espectro Infrarrojo de los productos obtenidos mediante el método de hidrólisis ácida (Cáscara de camarón(azul) –quitosano (rojo)).

El proceso refleja una superposición de especies que posiblemente se deba a la precipitación de proteínas presentes en el medio debido a la desproteínización incompleta, esto atribuido a la ausencia de la etapa de purificación previas dentro del proceso planteado que limite las especies presentes en el electrolito soporte.

Comparando los tres métodos se puede identificar que el proceso químico presenta una mayor amplitud en la banda debida al modo de vibración del enlace amina (N-H)

a los 1421-1574 cm^{-1} en comparación con el método de electrólisis forzada, la amplia intensidad presente en el espectro infrarrojo respectivo al método de hidrólisis ácida, se asocia a la presencia de proteínas que aportan una gran cantidad de grupos amina que enriquecen el producto. Se puede identificar que la influencia de método de síntesis de quitosano radica principalmente en la etapa de purificación del proceso reduciendo interferencias en la caracterización química y la producción de subproductos que pueden resultar dentro del proceso.

8.1.4– DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)

Para llevar a cabo la evaluación, una muestra de cada paso del proceso de obtención del quitosano fue analizada por DRX, la indexación del espectro de difracción se realizó con la ayuda del software MATCH 3! que incluye la base de datos COD-Inorg (Power Diffraction Data Base).

(i) Método químico.

Los resultados debidos al método químico de la fase encontrada se muestran en el siguiente difractograma (Figura 1.35). Donde se puede observar un pico principal de gran intensidad a $2\Theta = 19,5^\circ$ y un pico secundario en $2\Theta = 10^\circ$, en todos los difractogramas, pero con una menor intensidad en los difractogramas de quitosano comparado con el presentado por la quitina; sin embargo, la intensidad de los picos muestra cristalinidad en la quitina y en la especie primaria de quitosano. Todas las muestras presentan espectros similares a los reportados en la literatura [98, 99, 100].

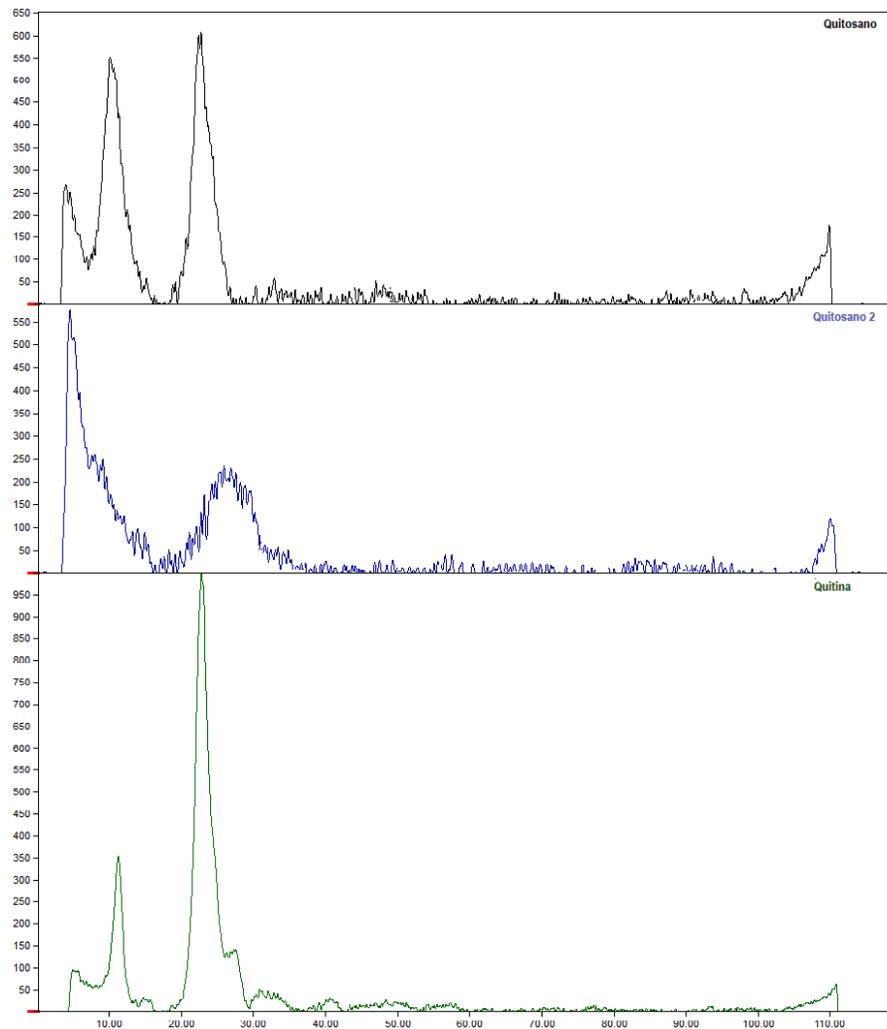


Figura 1.35. Análisis comparativo de quitina –qitosano producto del método químico por DRX.

(ii) Método de electrólisis forzada.

De igual manera se realizó el análisis por difracción de Rayos X para el proceso electroquímico (figura 1.36). Donde, para la quitina se identificó un pico principal a $2\Theta = 22.5^\circ$ y un pico secundario a $2\Theta = 10^\circ$ donde se puede identificar la fase alfa quitina asociada a su ordenamiento que refleja su grado de cristalinidad debido a la baja anchura de sus picos. En cuyo caso dicho comportamiento se ve modificado para el qitosano que muestra un pico principal a $2\Theta = 25^\circ$ y un pico secundario en $2\Theta = 10^\circ$, estos picos presentan un ancho de mayor grado con respecto al de quitina, atribuido a la formación de una fase amorfa de qitosano debido a las condiciones heterogéneas del proceso, asemejándose al proceso de desacetilación química heterogénea.

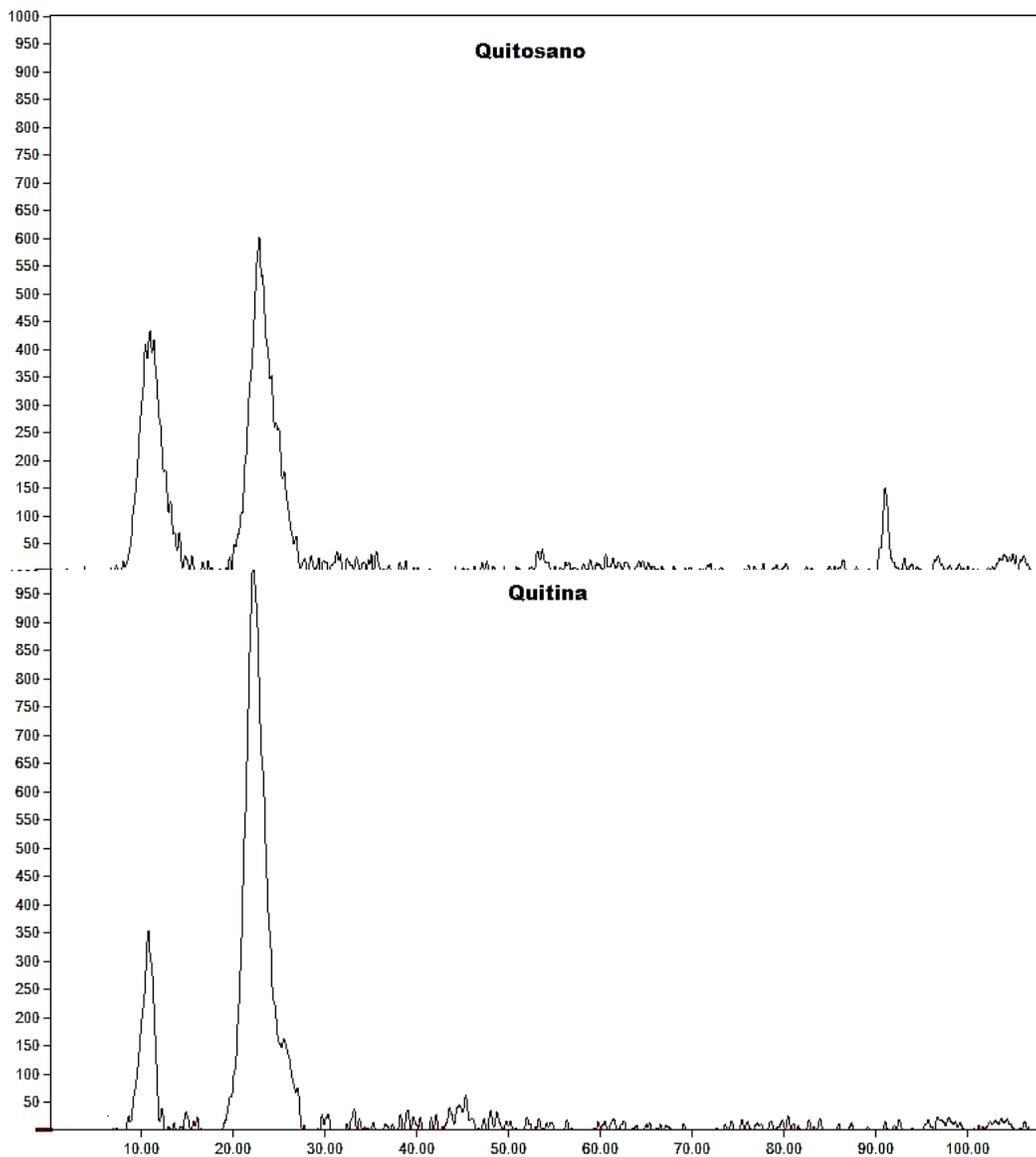


Figura 1.36. Análisis comparativo de quitina –qitosano producto del método de electrólisis forzada por DRX.

(iii) Método de Hidrólisis Ácida.

De igual manera se realizó el análisis por difracción de Rayos X para el proceso electroquímico efectuado mediante el método de hidrólisis ácida (figura 1.37). Donde, se visualizan diferente comportamiento cristalino, los mismos que obedecen a diferentes especies, principalmente se puede ver picos que interfieren a $2\Theta = 37$ y 39° que se atribuyen a especies de proteínas que al no efectuarse un método de purificación previo y la presencia de cationes se asocian al depósito del producto y como especie secundaria en $2\Theta = 10^\circ$ y 33° , donde se identifica la fase alfa quitina

predominando sobre una fase amorfa de quitosano debido a las condiciones del proceso.

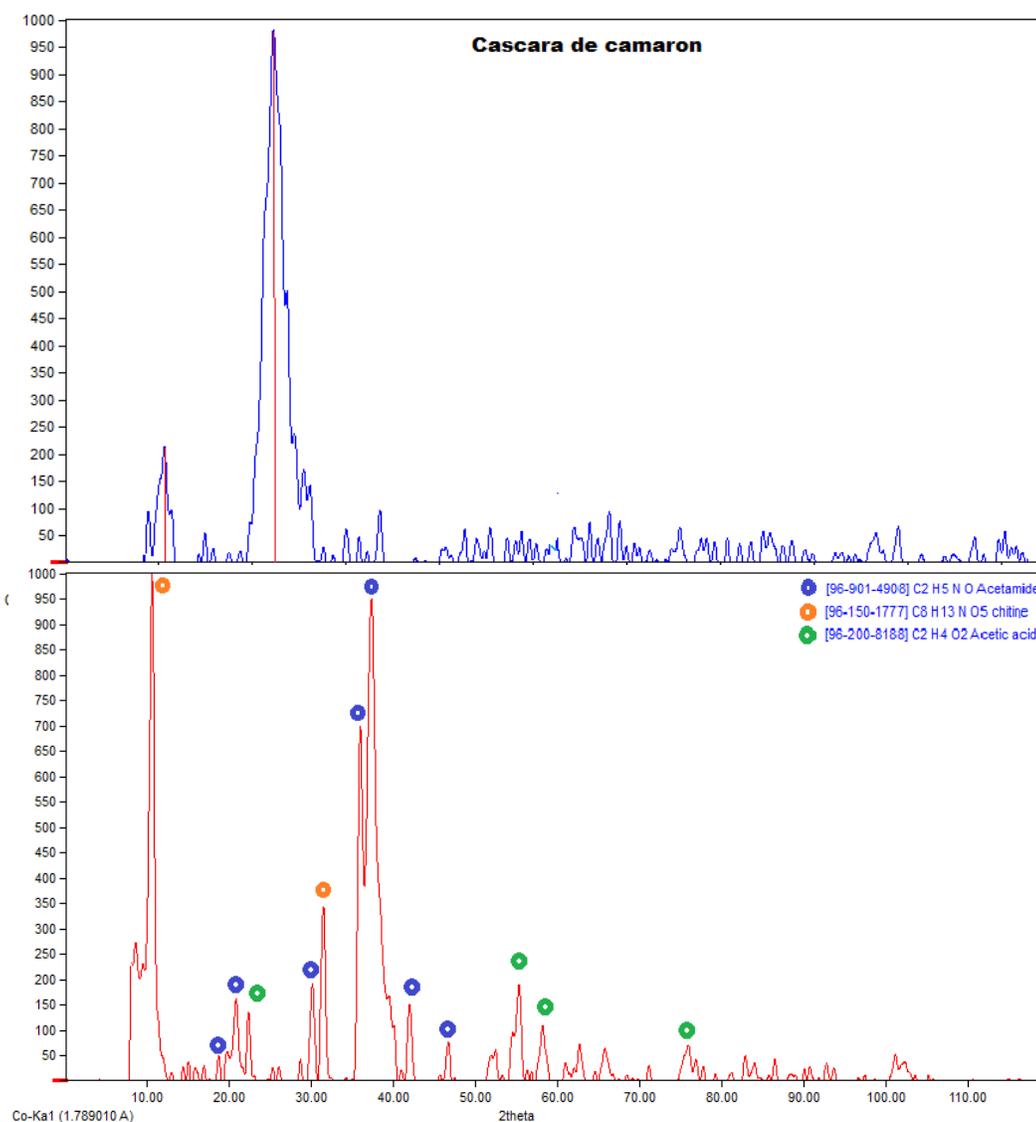


Figura 1.37. Análisis comparativo de cáscara de camarón –quitosano producto del método de hidrólisis ácida por DRX.

8.1.5– DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR Y VISCOSIDAD

Los parámetros viscosimétricos se midieron a 25 ± 0.05 °C utilizando un viscosímetro capilar Ubbelohde C529 con un diámetro capilar de 0,63 mm, en un baño María a temperatura controlada. La determinación experimental de la viscosidad intrínseca, por extrapolación, se realizó cronometrando el flujo de las diferentes concentraciones de quitosano y el flujo de la solución madre inicial de ácido acético 0.1M. Los valores del

tiempo de flujo presentes en la tabla 1.4, fueron empleados para determinar los valores de viscosidades intrínsecas empleando el método gráfico (Figura 1.38) [101], correspondiendo al promedio de al menos tres mediciones de tiempo con variación menor al 0.09% entre ellas. Para determinar el valor del peso molecular se empleó la ecuación de Mark-Houwink con los valores de a de 0.93 y K de 0.00181 (mL/g) [102].

Tabla 1.4. Resultados de análisis viscosimétrico a 25°C en Ácido Acético de quitosano

Concentración(g/mL)	Tiempo (segundos)	Viscosidad relativa	Viscosidad específica	Viscosidad reducida
0.003	2741.1	4.346	3.346	1115.443
1.00E-03	1214.9	1.926	0.926	926.364
5.00E-04	958.59	1.520	0.520	1039.910
1.00E-04	706.07	1.120	0.120	1195.554
0	630.67	1.000	---	---

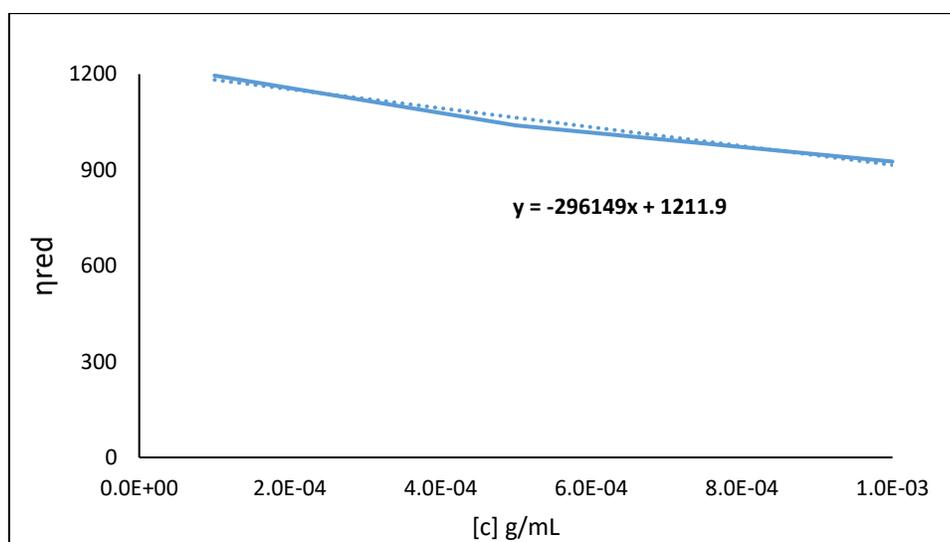


Figura 1.38. Analisis representativo de Huggins a 25°C en Ácido Acético para quitosano.

Se puede determinar mediante la pendiente del gráfico el valor de la viscosidad intrínseca que proporciona el volumen específico efectivo del polímero y depende del tamaño y forma de la molécula de quitosano y la relación de soluto-solvente cuyo valor obtenido fue de 1211.9 mL/g. De igual forma con ayuda de la ecuación de Mark Houwink se logró determinar el peso molecular promedio viscoso del polímero, obteniendo un valor de 1,837,758.324 g/mol para el quitosano producto del proceso electroquímico.

8.2.- CARACTERIZACIÓN DEL HIDROGEL

El desarrollo de hidrogeles basados en la reacción de entrecruzamiento entre el quitosano y agentes reticulantes de tipo dialdehídos ha sido empleado en un gran número de investigaciones [103, 104, 105], con aplicaciones muy diversas por tratarse de un material natural altamente biocompatible y biodegradable; sin embargo, los estudios que describen las capacidades de estos hidrogeles son escasos [106]. Por estas razones, y con la finalidad de comprobar la actividad entrecruzante del quitosano extraído de la cáscara de camarón, se prepararon hidrogeles de quitosano con distintas proporciones de agente entrecruzante para estudiar sus propiedades químicas, físicas y mecánicas.

La síntesis de los hidrogeles de quitosano (Q) se realizó de acuerdo al procedimiento descrito previamente (tabla 1.5), manteniendo constante la concentración de quitosano, y variando tanto las relaciones de agente dialdehído como las condiciones energéticas del proceso, con la finalidad de estudiar el efecto que puede presentar sobre las mismas la cantidad de agente entrecruzante empleado, el pH en el que se desarrolla la reacción, la temperatura y, además, el medio usado para el proceso.

Tabla 1.5. Condiciones de reacción de la síntesis de hidrogeles de CS

[CS]	Solvente	Agente Entrecruzante	Conc. De Agente Entrecruzante	Método de Entrecruzamiento
3%	Ac. Acético	Glioxal	20 %	Químico
			30 %	
			40 %	
		Glutaraldehído	20 %	
			30 %	
			40 %	
	Ninguno	Glioxal	20 %	Electroquímico
			30 %	
			40 %	
		Glutaraldehído	20 %	
			30 %	
			40 %	
3%	Ninguno	Glioxal	20 %	Mecanosíntesis
			30 %	
			40 %	
		Glutaraldehído	20 %	
			30 %	
			40 %	

8.2.1- CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES (MEDIO QUÍMICO CONVENCIONAL)

En esta sección se muestran los análisis químicos realizados a los productos obtenidos (hidrogeles) del proceso de entrecruzamiento. Asimismo, se muestran resultados de caracterización electroquímica, de absorción de agua y material soluble; cuando se utilizó entrecruzantes de glioxal, glutaraldehído y butanodiona cada uno al 20, 30 y 40% en concentraciones.

8.2.1.1.- DETERMINACIÓN QUÍMICA ESTRUCTURAL DE QUITOSANO POR F-TIR

En la Figura 1.39 y 1.40 se muestran los conjuntos de espectros obtenidos por FT-IR al analizar las muestras de los hidrogeles con diferentes concentraciones de entrecruzante (glioxal y glutaraldehído) así como el espectro de quitosano puro como referente (espectro negro).

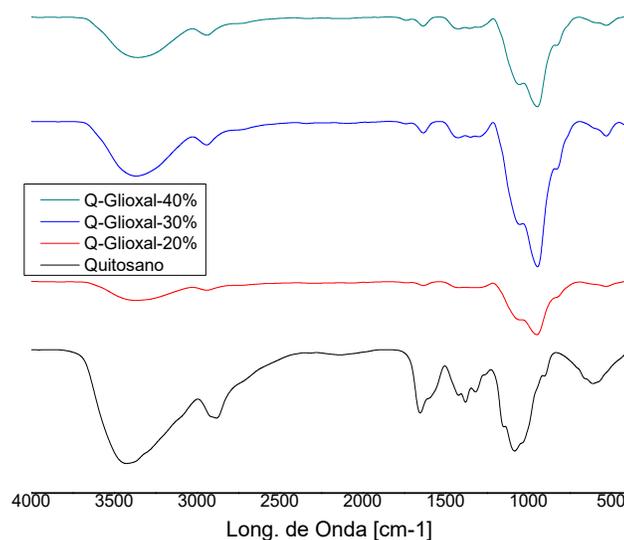


Figura 1.39. Espectro Infrarrojo evaluando concentración de agente entrecruzante mediante entrecruzamiento químico de quitosano (negro), Q-GXL 20% (rojo), Q-GXL 30% (azul) y Q-GXL 40% (verde).

En la Figura 1.39 se observan, de manera general, diferentes intensidades de las bandas correspondientes a la vibración del grupo imina (C=N), una nueva banda de vibración de tensión a 1608 cm^{-1} generada en el entrecruzamiento y estiramientos de los enlaces carbono hidrógeno (C-H) del quitosano y glioxal localizadas alrededor 2950 cm^{-1} respectivamente.

Por otro lado, se observó que la reacción de entrecruzamiento por glioxal óptima se presentó en una concentración de GXL al 30%, donde las bandas de vibración del grupo imina y las bandas de los enlaces carbono hidrógeno son más intensas debido al mayor grado de entrecruzamiento que sufre la estructura del quitosano. En el caso en el que se emplea una concentración al 20% de agente entrecruzante, este limita la reacción de entrecruzamiento, resultando en una estructura fluida, poco consistente. En cuanto a la concentración de 40% de glioxal la estructura presenta una cantidad exceso de agente entrecruzante sin reaccionar, provocando una disminución en las bandas atribuidas al proceso de entrecruzamiento, comparándolo con el proceso a 30%. De manera general en las tres muestras analizadas se observó que la banda alrededor de los 3100 a 3550 cm^{-1} perteneciente al grupo $-\text{OH}$, el cual solapa a los grupos $-\text{NH}_2$ en el espectro del quitosano es débil en el xerogel. El contenido relativamente bajo de grupos amino ($-\text{NH}_2$) en la estructura polimérica del biocompuesto se puede atribuir a la formación de bases de *Schiff* entre el grupo amino y los grupos aldehído, indicando el entrecruzamiento entre los $-\text{NH}_2$ con el agente entrecruzante (glioxal). Sin embargo, el biocompuesto Q-GXL aún conserva un buen contenido de grupo amino que puede desempeñar un papel importante en la adsorción.

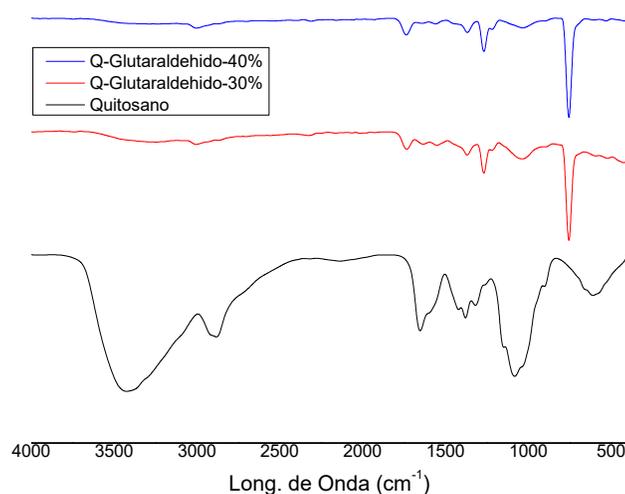


Figura 1.40. Espectro Infrarrojo evaluando concentración de agente entrecruzante mediante entrecruzamiento químico de quitosano (negro), Q-GTR 30% (rojo) y Q-GTR (azul).

Se puede visualizar que el entrecruzamiento de quitosano con glutaraldehído (figura 1.40) muestra una disminución en la banda localizada a 1572 cm^{-1} , lo que indica la formación de enlaces imina debido a la reacción de reticulación de los grupos amino libres del quitosano con los grupos aldehídicos de GTR. La ausencia de pico en la región de $1740\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ indica la ausencia de un grupo aldehído en el producto reticulado y, por lo tanto, cualquier GTR residual sin reaccionar se puede observar en la presencia de una banda fuerte a 1660 cm^{-1} que se puede atribuir a la formación de enlaces imina debido a la reticulación. La reticulación del quitosano con GTR resulta en productos que muestran una absorción reducida para los picos de vibración de estiramiento O–H y N–H, se desplaza la vibración de estiramiento C – N a 1438 cm^{-1} a 1406 cm^{-1} . Finalmente, los picos de quitosano a 1363 cm^{-1} y 1155 cm^{-1} desaparecen, lo que indica que los dos picos pueden verse obstaculizados por la estructura reticulada del quitosano con glutaraldehído.

8.2.1.2.- CARACTERIZACIÓN CRISTALOGRÁFICA POR DRX

Adicionalmente se analizó el cambio de la estructura del quitosano antes y después de la reticulación con glioxal y glutaraldehído mediante DRX en polvo, que es una herramienta probada para estudiar las disposiciones de la red cristalina y proporciona información muy útil sobre el grado de cristalinidad de la muestra.

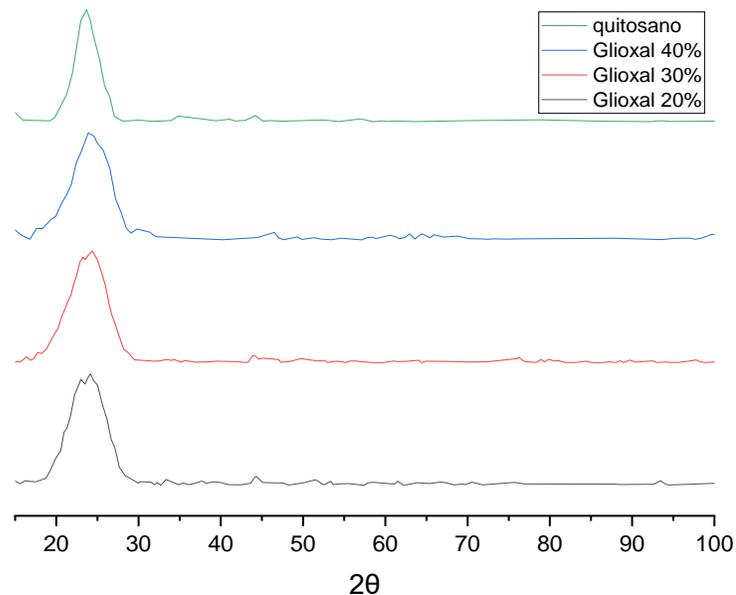


Figura 1.41. Difractograma comparativo de productos del entrecruzamiento químico de Quitosano (negro), Quitosano – GXL 30% (rojo), Quitosano-GXL (azul) y Quitosano-GXL (verde).

En los espectros DRX del polvo de quitosano reticulado mediante gloxal presentes en la figura 1.41, se visualiza el pico agudo característico a $2\theta = 23^\circ$. En el diagrama del quitosano reticulado con gloxal, la intensidad de este pico característico se debilita y a su vez el ancho de pico de quitosano aumenta, esto es característico a la modificación de la estructura resultante y es indicativo de la modificación estructural debido al proceso de entrecruzamiento (visible en el ensanchamiento de los picos). Esta característica se puede atribuir por una disminución en el número de grupos $-NH_2$ en la cadena polimérica del quitosano tras la modificación de la base de Schiff.

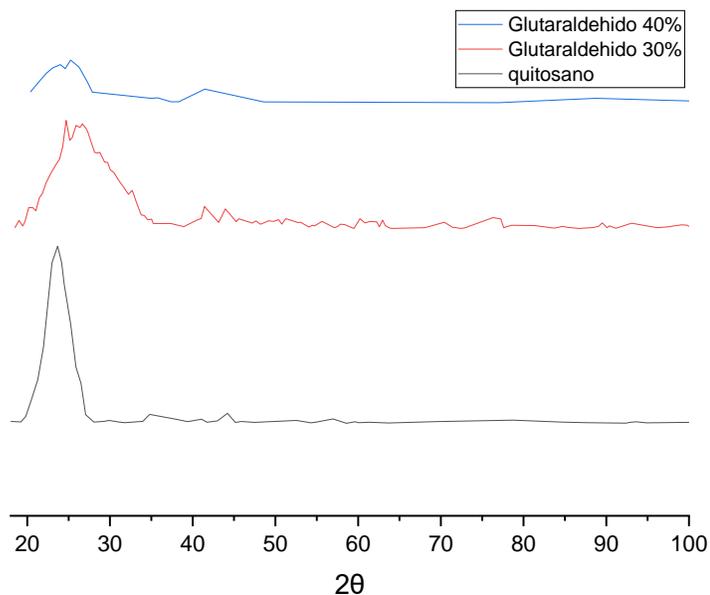


Figura 1.42. Diffractograma comparativo de productos del entrecruzamiento químico de Quitosano (negro), Quitosano – GTR 30% (rojo) y Quitosano-GTR (azul).

El patrón de difracción del quitosano en este estudio muestra un pico de difracción nítido a $2\theta = 23^\circ$, revelando una estructura de mayor ordenamiento para el quitosano puro. Sin embargo, con respecto a Q-GTR, este pico característico en $2\theta = 23^\circ$ desaparece, y aparece un pico muy débil y ancho centrado en $2\theta = 25^\circ$ (Figura 1.42). Esta diferencia en los patrones de difracción entre el quitosano y el Q-GTR debe atribuirse a la reacción de entrecruzamiento entre el quitosano y el glutaraldehído. De acuerdo con el resultado de estudios previos, el ordenamiento del compuesto reticulado disminuye por la reticulación debida a la cadena del dialdehído [107]. Esto podría atribuirse a la deformación del fuerte enlace de hidrógeno en el quitosano original debido a la sustitución de grupos hidroxilo y amino, que destruyeron eficientemente la regularidad del empaquetamiento de las cadenas de quitosano originales y dieron como resultado la formación de quitosano entrecruzado con un mayor grado de desorden en su estructura tridimensional.

8.2.1.3.- DETERMINACIÓN DE LA RAPIDEZ DE ABSORCIÓN DE AGUA

En las Figuras 1.43 se muestran los comportamientos de la absorción de agua para cada compuesto entrecruzado (Q-GXL), en función del tiempo en una atmósfera con humedad relativa controlada del 100% de humedad. Cabe mencionar que los productos resultado del proceso de entrecruzamiento químico mediante el agente glutaraldehído (Q-GLT) presentaron una solubilidad alta en la solución empleada para tal prueba, por tal motivo no se presenta resultado aparente.

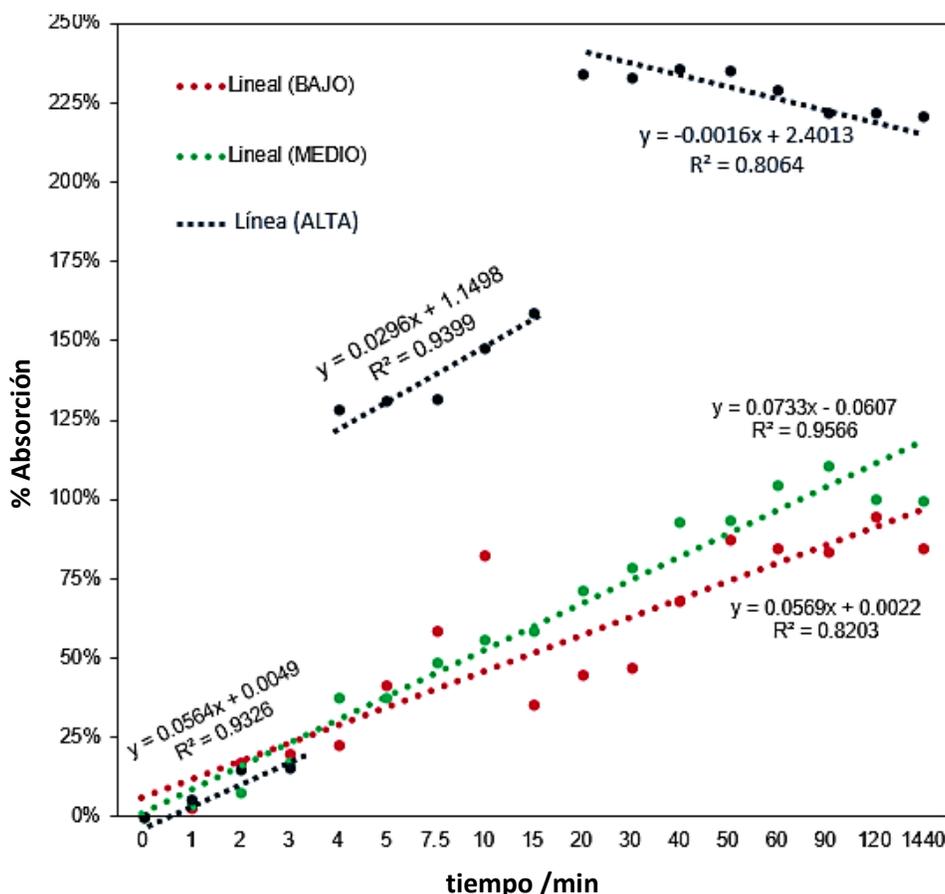


Figura 1.43. Absorción de agua de hidrogel de Q-GXL al 20% (naranja), 30% (verde) y 40% (negro) en atmósferas con humedad relativa controlada.

Los hidrogel de quitosano entrecruzados al 20, 30 y 40% presentan un porcentaje de agua absorbida relativamente altos llegando a sus máximos valores de absorción a un tiempo de 120, 90 y 40 minutos respectivamente. En los hidrogel de Q-GXL entrecruzado al 40%, el contenido de agua absorbida es mayor siendo este de 235.9%

en comparación con el del 20 y 30% llegando a un máximo de absorción de 94.18 y 111.18% en peso; no obstante, la tendencia observada en las curvas es semejante llegando a rapidez de absorción de 0.056%/min, 0.07%/min y 0.16%/min para hidrogeles de Q-GXL entrecruzados al 20, 30 y 40%, respectivamente.

8.2.1.4.- DETERMINACIÓN DE ADHERENCIA

Se realizaron las pruebas de adherencia en un dispositivo de elongación manual adaptado a una báscula digital, con el fin de identificar el esfuerzo de ruptura del polímero soportado en dos placas de cristal. Los resultados son presentados en la Figura 1.44 para el glioxal.

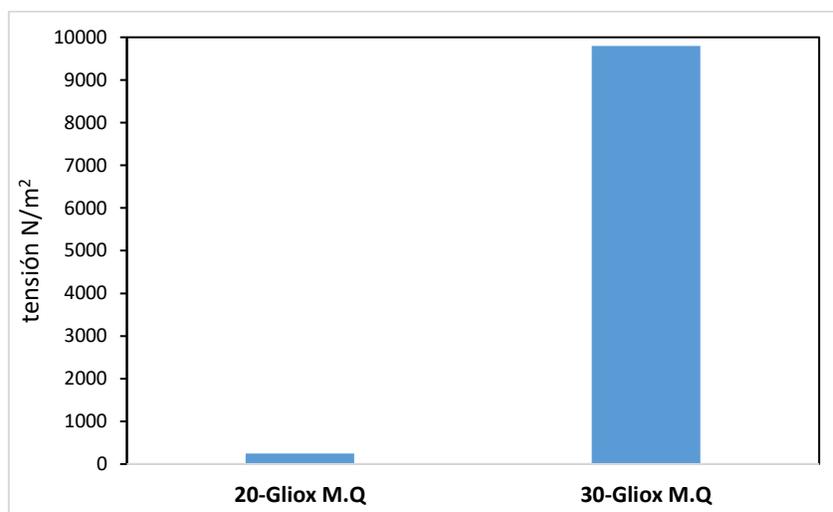


Figura 1.44. Esfuerzo de ruptura de Q-GXL, al 20% y 30% de entrecruzante.

Se puede visualizar la presencia de adherencia en únicamente dos de los tres compuestos obtenidos, siendo estos los de 20 y 30% de agente glioxal, esto atribuido a que la baja concentración permite generar menos reticulación en la cadena principal del quitosano, que a su vez repercute en la dureza del material.

8.2.2- CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES OBTENIDOS POR ENTRECruzAMIENTO MEDIANTE EL METODO ELECTROQUÍMICO

En esta sección se muestran los análisis realizados a los productos obtenidos (hidrogeles) del proceso de entrecruzamiento mediante método electroquímico. Asimismo, se muestran resultados de caracterización electroquímica, de absorción de

agua y material soluble; cuando se utilizan entrecruzantes de glicoxal y glutaraldehído cada uno al 20, 30 y 40% en concentraciones, bajo la técnica de cronopotenciometría.

8.2.2.3.- CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE HIDROGELES

En la Figura 1.45 se muestra la respuesta electroquímica de la evaluación de la cinética de la reacción al imponer un potencial de 10 V en un medio de Q-Ac. Usando como electrolito soporte ácido acético.

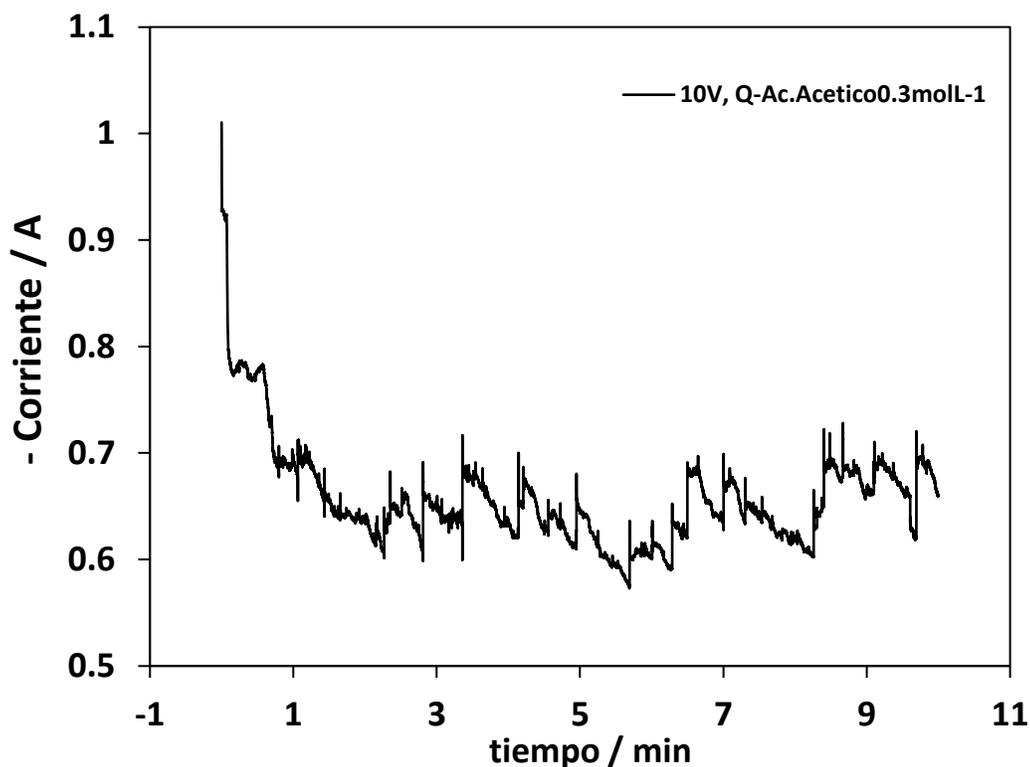


Figura 1.45. Cronoamperograma del sistema $Ti|Q-Ac\text{ Acético}|Ti-RuO_2$; $E=10V$.

De acuerdo a los resultados se observa que el proceso electroquímico tiene una carga capacitiva en el primer minuto, posteriormente se aprecian fluctuaciones de corriente de 0.7 – 0.5 A en intervalos de 0.5 a 1 minuto, asimismo, durante el proceso se aprecia visualmente burbujeo debido a la evolución de hidrógeno; lo cual puede asociarse a los cambios de corriente observados debido a la variación de la superficie del electrodo al formarse burbuja en la superficie. Por lo que se determina que durante la REH se están llevando a cabo reacciones de acoplamiento químico, las cuales generan como

producto el depósito de una película de hidrogel sobre el sustrato de Ti, por lo que para las siguientes evaluaciones se consideran las corrientes a -500 mA, -600 mA y -700 mA.

En la Figura 1.46 se exhiben las respuestas potenciométricas de reducción para la evaluación termodinámica del sistema $Ti|Q\text{-Ac. Acético}|Ti\text{-RuO}_2$, para determinar los distintos procesos que se llevan a cabo bajo las corrientes de -500 mA, -600 mA y -700 mA.

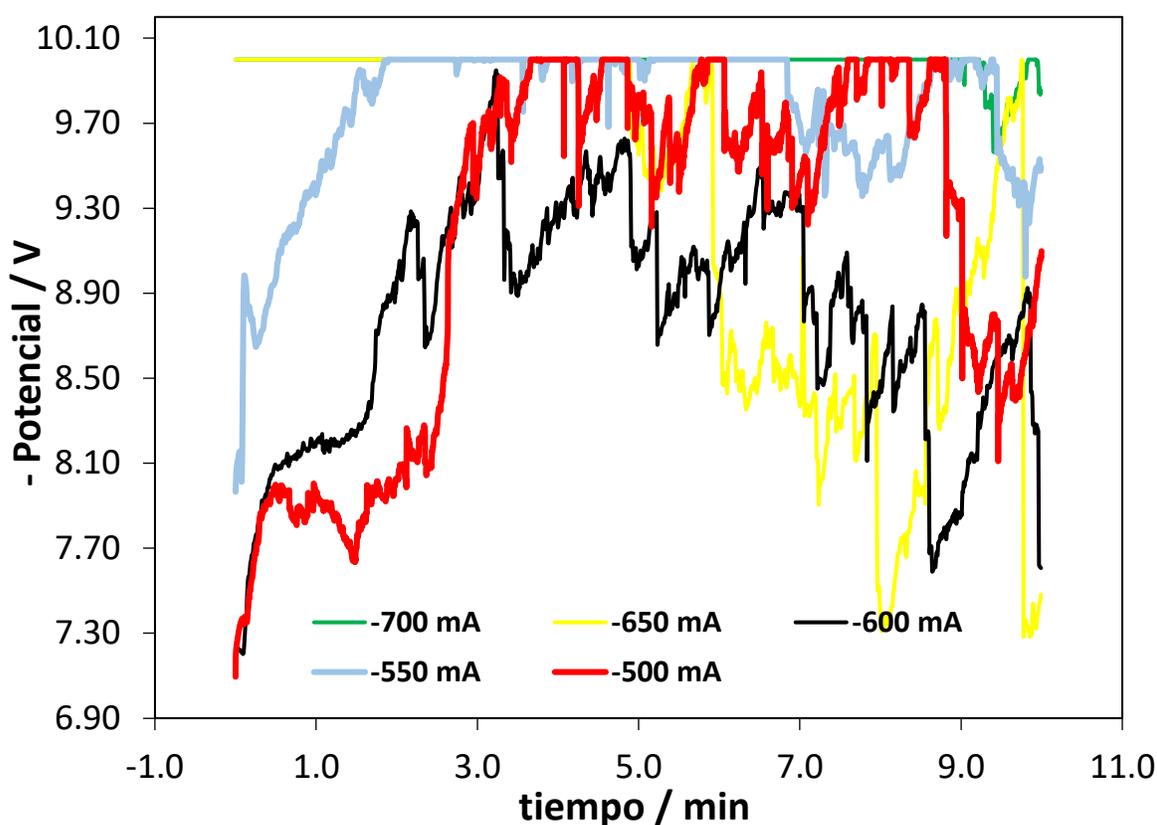


Figura 1.46. Cronopotenciograma del sistema $Ti|Q\text{-Ac Acético}|Ti\text{-RuO}_2$; $i = -500\text{mA}$ (rojo), -550mA (azul), -600mA (negro), -650mA (amarillo) y -700mA (verde).

De acuerdo a la figura se observa que existen diferentes procesos acoplados a la evolución de hidrógeno los cuales se consideran químicos-electroquímicos (Q-EQ), debido a que la REH limita el depósito del hidrogel de quitosano en la superficie del área electroactiva; lo cual, favorece la protonación del grupo amina de las cadenas de quitosano en la superficie del cátodo. Como primera respuesta potenciométrica a -

500mA se observa un proceso que se lleva a cabo a -8 V el cual da un cambio abrupto a partir del tercer minuto de inicio de la reacción manteniendo un voltaje de 10 V hasta el minuto 9 donde sufre una caída de potencial nuevamente a 8.2 V atribuido a una deficiencia energética interrumpida por procesos de REH. Sin embargo, se obtuvo una película de hidrogel muy delgada como depósito; el segundo caso a -550mA el proceso se eleva por encima de -10V aumentando el proceso de evolución de hidrógeno aumentando el volumen del depósito en el sustrato; a -600mA se identifica un proceso fluctuante que inicia a 8.2V he incrementa a los 2 minutos del proceso a 9V, sufriendo una caída de potencial constante a partir de los 7 minutos de iniciar el proceso hasta un potencial final de 7V, dicho proceso se atribuye únicamente a procesos de REH que repercutiendo en una casi nula presencia de depósito en el cátodo, donde, debido a la cantidad de corriente a -650mA la reacción logra sobrepasar los 10 V hasta un tiempo de 4.5 minutos de inicio de la reacción, donde desciende constantemente hasta un potencial de 7.3 V. Finalmente a -700mA se observa un proceso que se eleva por encima de los 10 V hasta un tiempo de 9 minutos donde presenta una perturbación hasta terminar el proceso atribuida a la resistencia del depósito que cubre el área electroactiva; dando como resultado visualmente una mayor generación de película depositada en la superficie del cátodo.

Adicionalmente se realizó un estudio por espectroscopía de impedancia electroquímica con el fin de obtener las resistencias al flujo eléctrico del material y así mismo, la conductividad que posee tanto el quitosano como los productos del entrecruzamiento (Q-GXL y Q-GTR). Asumiendo que las reacciones que se llevan a cabo en el electrodo obedecen a dos procesos; uno debido a la doble capa que se genera en la interfase y que recuerda el comportamiento de un condensador, y el otro corresponde a la transferencia electrónica a través de la interfase que se produce como un proceso faradaico [108].

Obedeciendo esta teoría, se asoció el comportamiento del depósito de quitosano con respecto a los resultados de los gráficos de la figura 1.48 y 1.49. Donde la reacción electroquímica se puede representar por medio del circuito equivalente propuesto por Randles [109]. Debido a que este sistema se ajusta a un mecanismo de reacción ion

dipolo, y se requiere de un proceso de polarización electroquímica para llevarse a cabo. Este circuito consta de una resistencia óhmica de la disolución entre los electrodos de trabajo y de referencia (R_{Ω}); una capacitancia interfacial (C_{DL}), que es la capacidad de la doble capa eléctrica en la interfase; y una resistencia de transferencia de carga (R_P), la resistencia de polarización en la interfase electrodo-disolución (figura 1.47).

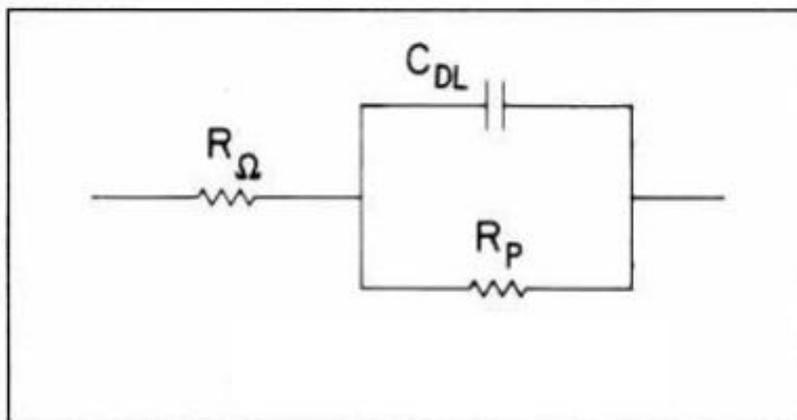


Figura 1.47. Circuito equivalente para un sistema electroquímico sencillo [110].

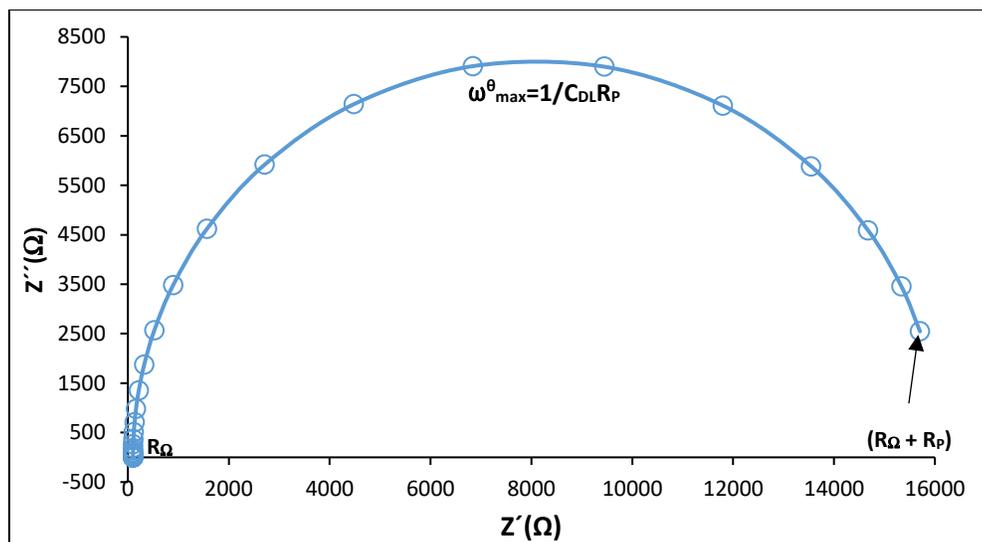


Figura 1.48. Diagrama de Impedancia Nyquist del sistema $Ti|Q\text{-Ac Acético}|Ti\text{-}RuO_2$.

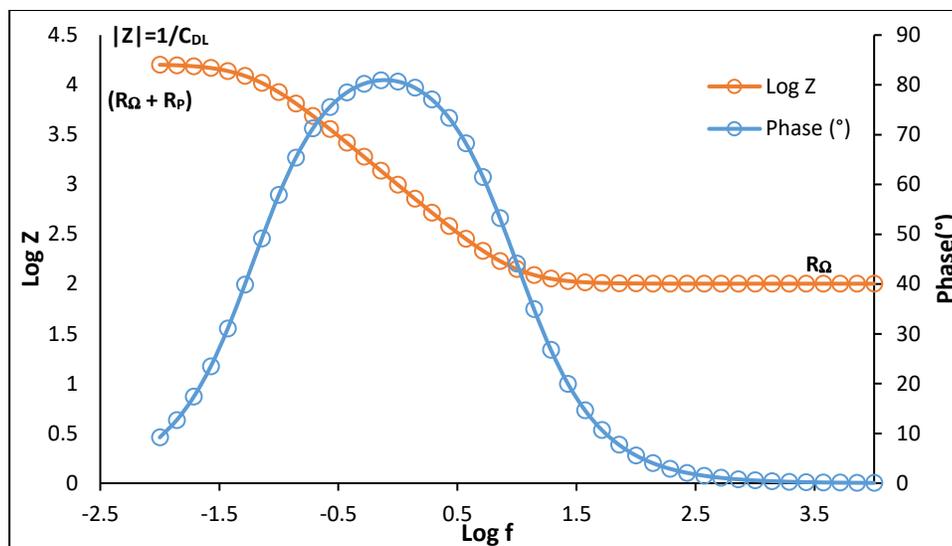


Figura 1.49. Diagrama de Impedancia Bode del sistema $Ti|Q\text{-Ac Acético}|Ti\text{-RuO}_2$.

De acuerdo al análisis de los espectros presentados los diagramas de la figura 1.48 y 1.49 para el depósito de quitosano bajo el modelo *Randles* permitió la extracción de los valores de R_{Ω} y R_P para el sistema siendo estos de 100.76 y 16,007.61 Ω respectivamente, de igual manera se obtuvo el valor del C_{DL} y el ω_{max}^{θ} cuyos valores son de 138.15 μF y 0.453 Hz.

Adicionalmente y comprobando la correspondencia del modelo propuesto se realizó el cálculo iterativo de convergencia mediante un equipo AUTOLAB *model* PGSTAT 30 el software NOVA 2.0.1 adquiriendo los valores reportados en el la figura 1.50, donde se puede corroborar la relación con los valores obtenidos mediante los gráficos de Nyquist y Bode para este caso. Se puede visualizar en la representación de Nyquist (figura 1.48) un semicírculo deprimido asociado al recubrimiento orgánico sobre el electrodo de trabajo, el proceso presenta una resistencia considerable (16 $K\Omega$) atribuida al proceso de transferencia de carga (R_P) esto corroborando la formación de una película que inhibe la conductividad del proceso, la rugosidad de este depósito o baja homogeneidad del electrodo sólido metálico se puede ver debida a la presencia de un gradiente de tipo $-\partial \log |Z| / \partial \log f$ con valores inferiores a la unidad. Adicionalmente, se observan en el diagrama de Bode (figura 1.49) regiones no lineales a bajas frecuencias, lo que se debe normalmente a procesos regidos por la difusión de especies del seno de la solución a la superficie electroactiva.

Dicho proceso de migración de especies del seno de la solución al área electro activa oscila alrededor de los 100 Ω . Se puede observar un proceso capacitivo cuya frecuencia óptima se encuentra alrededor de los 1.3Hz. Dicho proceso es de una capacitancia baja (138-162 Ω) lo que se atribuye a la dependencia del proceso electroquímico al proceso químico en cuyo caso es optimizado por la evolución de hidrógeno y a la ausencia de un agente ligante. Donde de igual manera se verificó la tendencia del error atribuido a este circuito con el proceso constatando la aleatoriedad.

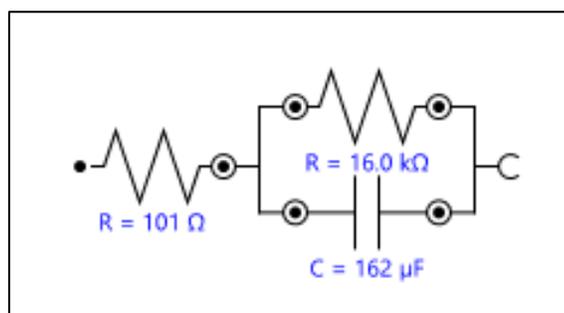


Figura 1.50. Circuito sencillo [R(RC)] para el sistema $\text{Ti}|\text{Q-Ac Acético}|\text{Ti-RuO}_2$.

En los procesos asociados a los productos entrecruzados mediante agentes GXL y GTR se visualizan las reacciones electroquímicas representadas por medio del circuito equivalente propuesto por *Cole-Cole* (Figura 1.51) propuesto para un sistema de un metal recubierto por un polímero no conductor [111, 112]. Dicho circuito permite interpretar el proceso clave de la síntesis electroquímica que se centra en el agente entrecruzante, el cual genera un recubrimiento orgánico en el electrodo de trabajo pasivando la superficie del mismo, inhibiendo las reacciones en la doble capa y aumentando la resistencia sobre la superficie del mismo. Dicha distribución consiste en una resistencia óhmica de la disolución entre los electrodos (R_{Ω}), la capacidad de la doble capa eléctrica en la interfase (C_{DL}); y una resistencia de transferencia de carga en la interfase electrodo-disolución (R_P). Adicional a este esquema se debe asociar la capacidad del recubrimiento (C_C) y la resistencia debida al poro (R_{PO}).

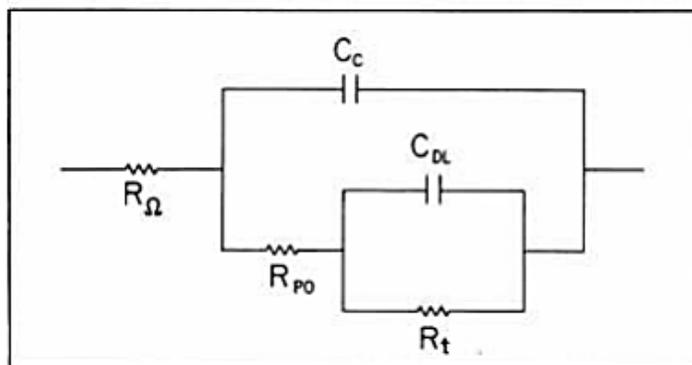


Figura 1.51. Circuito equivalente para la corrosión de un metal recubierto [110].

Lo que resulta en el correspondiente diagrama de *Bode* y *Nyquist* (Figura 1.52 y 1.53) asociados al comportamiento del quitosano entrecruzado con glioxal.

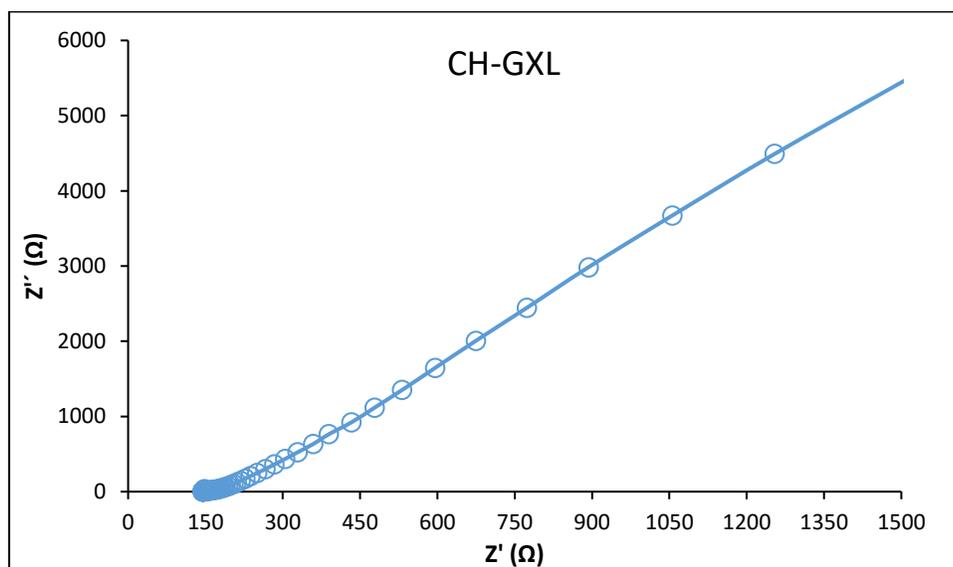


Figura 1.52. Diagrama de Impedancia Nyquist del sistema $Ti|Q-GXL|Ti-RuO_2$.

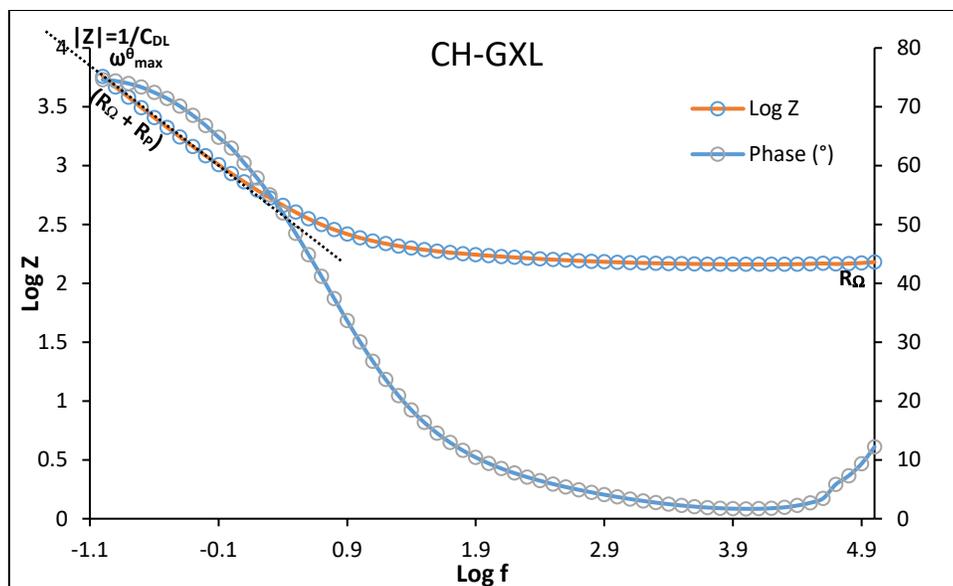


Figura 1.53. Diagrama de Impedancia Bode del sistema $Ti|Q-GXL|Ti-RuO_2$.

De acuerdo a los diagramas de la figura 1.52 y 1.53 para el depósito de quitosano entrecruzado con agente de tipo glioxal, se obtuvieron los valores de R_Ω y R_P para el sistema siendo estos de 151.78 y 6,181.71 Ω respectivamente. De igual manera se obtuvo el valor del C_{DL} y el $\omega^{\theta_{max}}$ cuyos valores son de 100 μF y 0.614 Hz.

Igualmente se realizó la convergencia simulada mediante análisis computacional del modelo propuesto encontrando los valores reportados en la figura 1.54, donde se pudo corroborar que el componente de tipo Warburg ($n=0.5$) asociado a la presencia de una pendiente de 45° en el gráfico de Nyquist (figura 1.52) muestra una disminución a la transferencia de carga en el proceso asociado a una etapa difusiva dentro del sistema propuesto. Adicionalmente, se puede ver una tendencia logarítmica en el diagrama de Nyquist (figura 1.52), esto se atribuye al aumento de la frecuencia asociado al aumento de impedancia que obedece una disminución en la permeabilidad del depósito en la superficie del electrodo de trabajo. De igual manera se asocian procesos difusivos a la baja linealidad del diagrama de Bode (figura 1.53) a frecuencias bajas. También, se puede visualizar una perturbación asociada al depósito, que sumado al agente entrecruzante mantiene la integridad de este depósito afectando el proceso, lo que genera un desfase (figura 1.53). De igual manera, se logró corroborar la tendencia oscilante del error asociado a la convergencia del modelo.

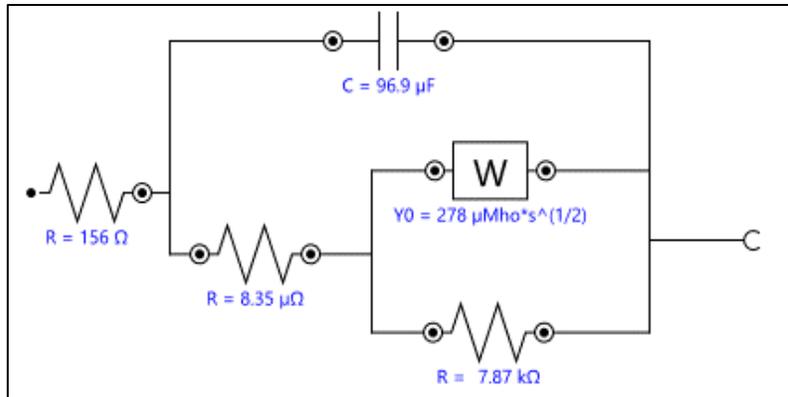


Figura 1.54. Circuito para un polímero no conductor $[R(RC|WR)]$ para el sistema $Ti|Q-GXL|Ti-RuO_2$.

Con los datos obtenidos se elaboraron los diagrama de *Bode* y *Nyquist* (Figura 1.55 y 1.56) asociados al comportamiento del quitosano entrecruzado con agente de tipo Glutaraldehído.

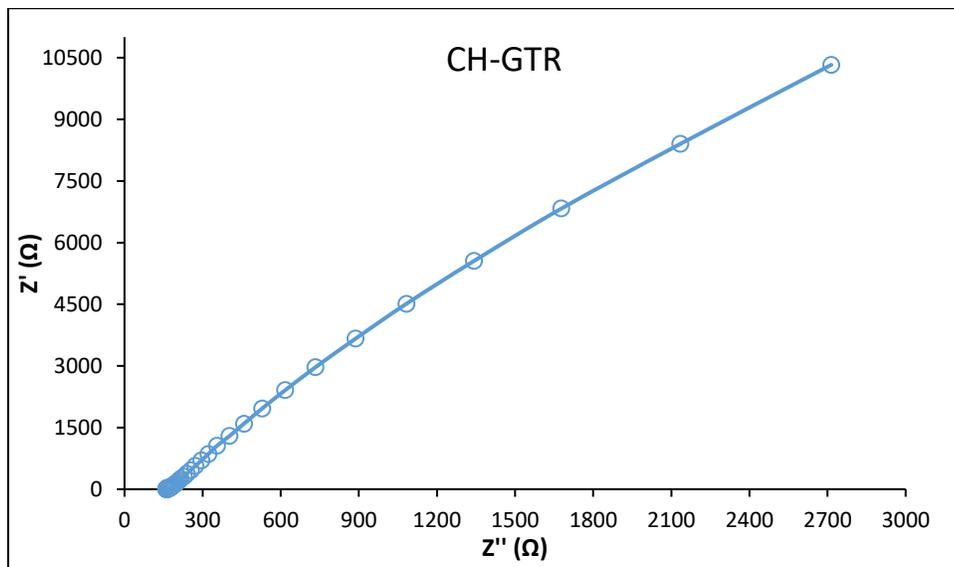


Figura 1.55. Diagrama de Impedancia Nyquist del sistema $Ti|Q-GTR|Ti-RuO_2$.

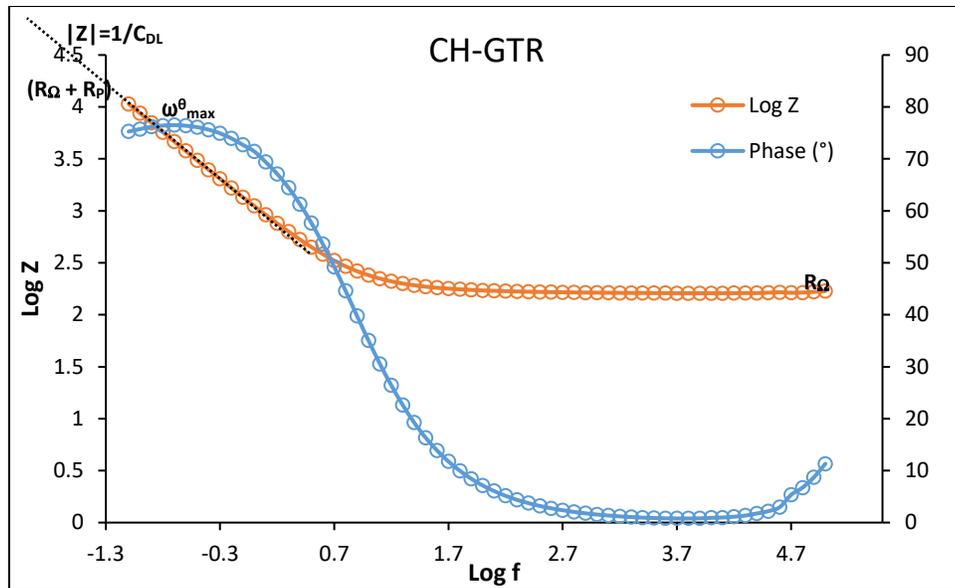


Figura 1.56. Diagrama de Impedancia Bode del sistema $Ti|Q-GTR|Ti-RuO_2$.

De acuerdo a los diagramas de la figura 1.55 y 1.56 para el depósito de quitosano entrecruzado con agente de tipo glutaraldehído se obtuvieron los valores de R_Ω y R_P para el sistema siendo estos de 168.85 y 4471.52 Ω respectivamente, de igual manera se obtuvo el valor del C_{DL} y el ω^0_{max} cuyos valores son de 109.81 μF y 1.25 Hz.

De manera similar, se realizó la convergencia simulada mediante análisis computacional del modelo propuesto encontrando los valores reportados en la figura 1.57 a partir del modelo de Nyquist (figura 1.55).

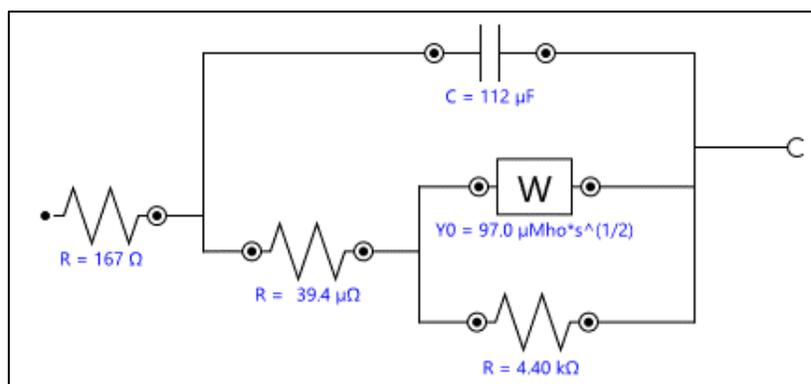


Figura 1.57. Circuito para un polímero no conductor $[R(RC|WR)]$ para el sistema $Ti|Q-GTR|Ti-RuO_2$.

Este esquema (figura 1.57) presenta de igual manera un componente tipo Warburg dentro de la configuración del sistema debido a un proceso difusivo como en el diagrama anterior (figura 1.55). En este arreglo se puede encontrar una mayor resistencia debida a los procesos asociados a la transferencia de carga y a la resistencia debida a la geometría del depósito, esto se debe principalmente a la estabilidad química del depósito asociada al agente entrecruzante, así como a la diferencia entre los valores de frecuencia desplazada e impedancia resistiva se asocian a factores determinados por la naturaleza del agente entrecruzante, como longitud de la cadena, impedimento estérico, geometría de la cadena, etc. Adicionalmente, se puede ver en el diagrama de Nyquist (figura 1.55) una tendencia logarítmica que se atribuye al aumento de la frecuencia asociado al aumento de impedancia que disminuye la permeabilidad del depósito en la superficie del electrodo de trabajo. De la misma forma se generó la tendencia del error asociado a la convergencia del modelo encontrando una aleatoriedad constante.

En lo general, los procesos asociados se pueden atribuir a reacciones no espontáneas de acuerdo a su termodinámica, debido a que la naturaleza del proceso es química y se ve favorecido por la influencia energética de los alrededores. Por lo cual, se puede atribuir el proceso a una celda electrolítica, donde es necesario el flujo de electrones para que se lleve a cabo la transformación. Esto se puede corroborar con los modelos propuestos y se concluye con los valores de resistividad en la interface electrodo|solución.

8.2.2.3.- DETERMINACIÓN DE LA RAPIDEZ DE ABSORCIÓN DE AGUA

En las Figuras 1.58 y 1.59 se muestran los comportamientos de la absorción de agua para cada compuesto entrecruzado (Q-GXL y Q-GTR), en función del tiempo en una atmósfera con humedad relativa controlada del 100% de humedad.

GLIOXAL M.EQ.

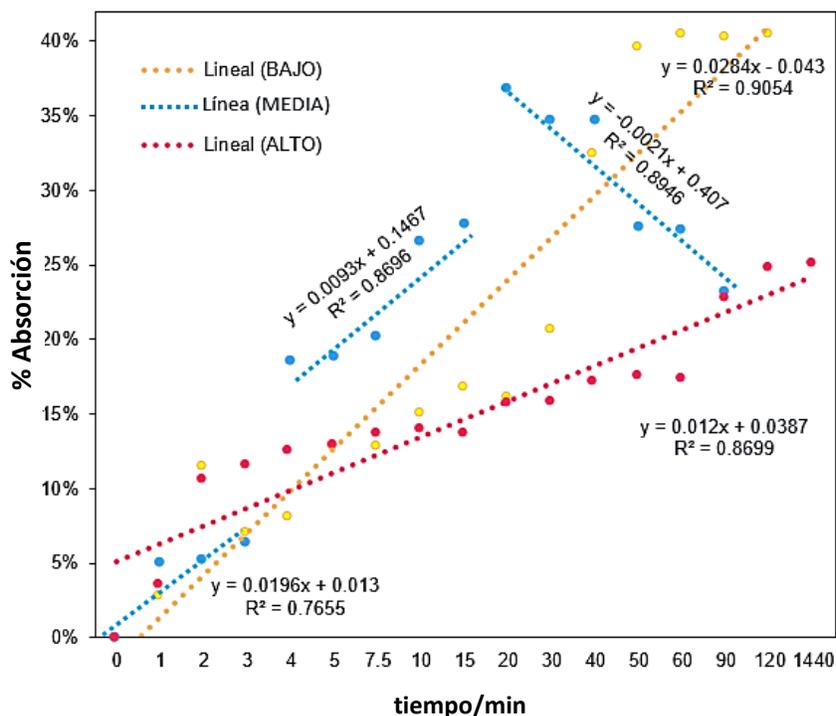


Figura 1.58. Absorción de agua de hidrogeles de Q-GXL al 20% (amarillo), 30% (azul) y 40% (rojo) en atmósferas con humedad relativa controlada.

Los hidrogeles de quitosano entrecruzados con glicoxal por método electroquímico al 20, 30 y 40% presentan un porcentaje de agua absorbida relativamente bajo llegando a sus máximos valores de absorción a un tiempo de 60, 20 y 1440 minutos respectivamente. En los hidrogeles de Q-GXL entrecruzado al 20%, el contenido de agua absorbida es mayor siendo este de 40.5% en comparación con el de 30 y 40% llegando a un máximo de absorción de solo 36.9 y 25% en peso, esto se atribuye a su morfología de tipo película; no obstante, la tendencia observada en las curvas es semejante, llegando a rapidez de absorción de 0.028, 0.022 y 0.012%/min para hidrogeles de Q-GXL entrecruzados al 20, 30 y 40%, respectivamente.

GLUTARALDEHIDO M.EQ.

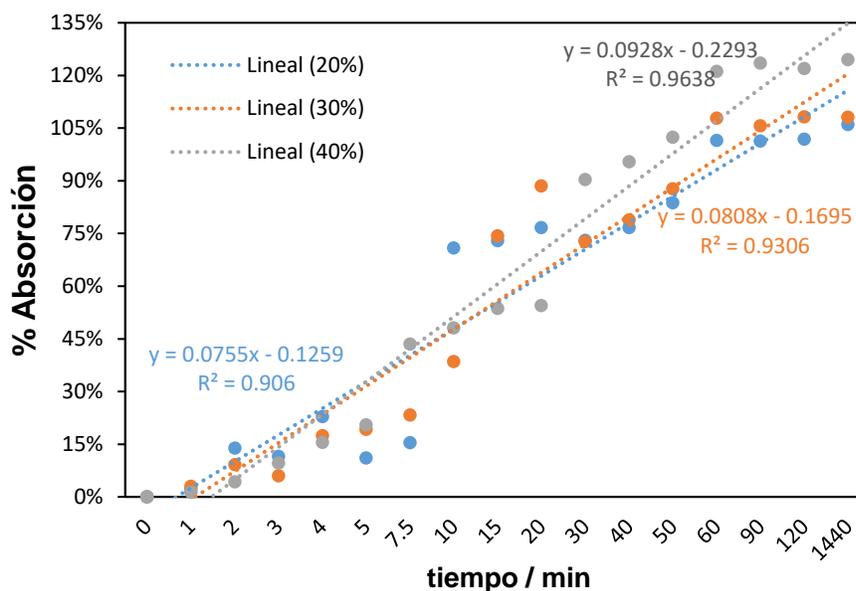


Figura 1.59. Absorción de agua de hidrogel de Q-GTR al 20% (azul), 30% (naranja) y 40% (gris) en atmósferas con humedad relativa controlada.

En el caso de los hidrogel de quitosano entrecruzados con glutaraldehído por método electroquímico al 20, 30 y 40% presentan un porcentaje de agua absorbida mayor en comparación a su contraparte empleando glioxal, llegando a sus máximos valores de absorción a un tiempo de 120, 120 y 1440 minutos respectivamente. En los hidrogel de Q-GTR entrecruzado al 40%, el contenido de agua absorbida es mayor siendo este de 124.5% en comparación con el de 20 y 30%, llegando a un máximo de absorción de solo 101.8 y 108.2% en peso, donde la mejora se puede atribuir a la longitud del glutaraldehído comparado con la longitud del glioxal. Esto repercute en la rapidez de absorción siendo de 0.075, 0.08 y 0.092%/min para hidrogel de Q-GTR entrecruzados al 20, 30 y 40%, respectivamente.

8.2.2.4.- DETERMINACIÓN DE ADHERENCIA

De igual manera se realizaron las pruebas de adherencia en un dispositivo de elongación manual adaptado a una báscula digital, con el fin de identificar el esfuerzo de ruptura del polímero soportado en dos placas de cristal. Cuyos resultados se presentan en las Figuras 1.60 para el Glioxal y Glutaraldehído.

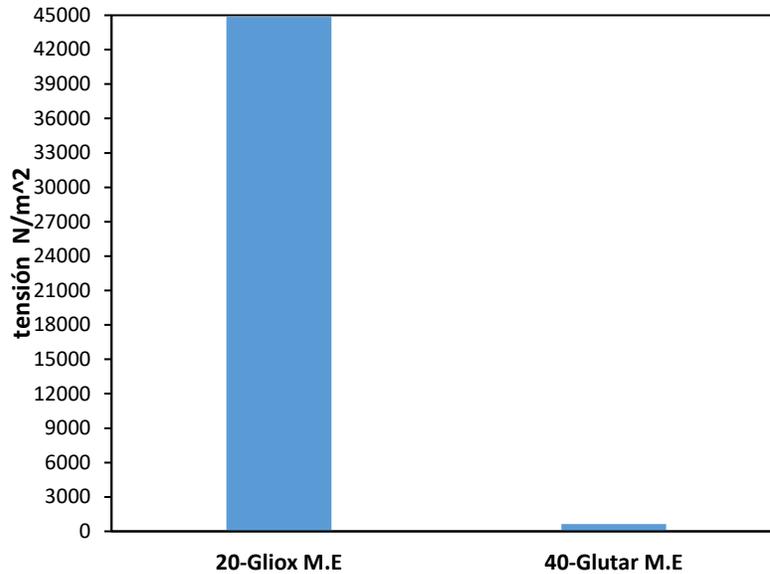


Figura 1.60. Esfuerzo de ruptura de Q-GXL al 20% y de Q-GLT al 30% de entrecruzante.

Se puede distinguir que únicamente dos compuestos presentaron una elongación debida a la adherencia en las placas de prueba, en el caso del Q-GLX se presentó en la concentración más baja de únicamente al 20%; esto atribuido al bajo grado de reticulación del compuesto permitiendo una alta adherencia, adicional al proceso de síntesis debido a que su estructura es en forma de película. De igual manera, para el Q-GLT se encontró un bajo comportamiento de adherencia en el compuesto que presenta el mayor grado de reticulación, esto debido a que la longitud de la cadena del entrecruzante no limita la adherencia debida a la reticulación del compuesto como en el caso del Q-GLX.

8.2.3- CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES OBTENIDOS POR ENTRECruzAMIENTO POR MECANOSÍNTESIS

En esta sección se muestran los análisis químicos realizados a los productos obtenidos (hidrogeles) del proceso de entrecruzamiento mecánico. Asimismo, se muestran resultados de caracterización química, de absorción de agua y material soluble; cuando se utilizan entrecruzantes de glioxal y glutaraldehído cada uno en concentraciones de 20, 30 y 40% .

8.2.3.3.- DETERMINACIÓN DE LA RAPIDEZ DE ABSORCIÓN DE AGUA

En las Figuras 1.61 y 1.62 se muestran los comportamientos de la absorción de agua para cada compuesto entrecruzado (Q-GXL y Q-GTR), en función del tiempo en una atmósfera con humedad relativa controlada del 100% de humedad.

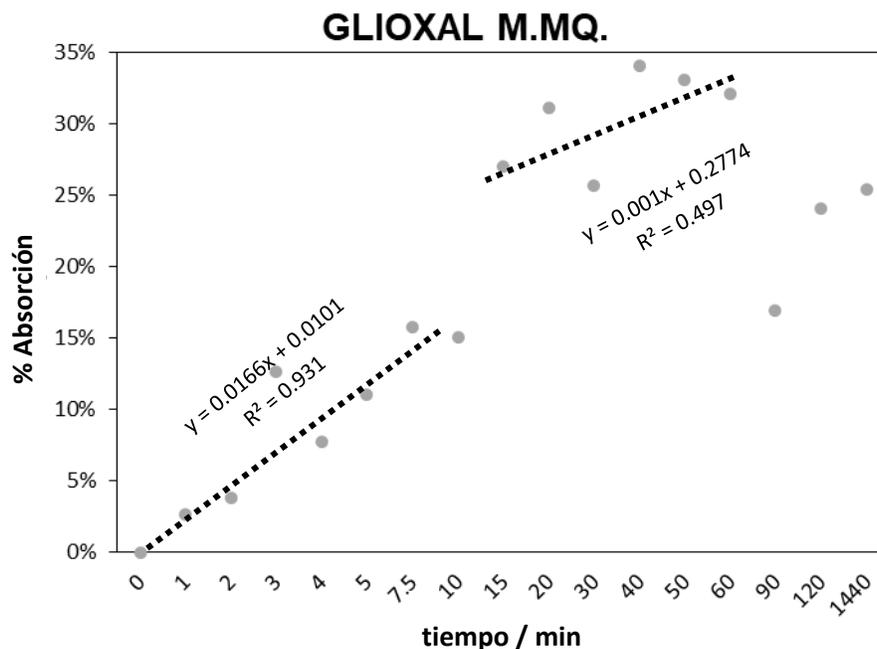


Figura 1.61. Absorción de agua de hidrogel de Q-GXL 40% (gris) en atmósferas con humedad relativa controlada.

El hidrogel de quitosano entrecruzado con glicoxal mediante mecanosíntesis al 40% presentó un porcentaje de agua absorbida relativamente bajo llegando a sus máximos valores de absorción a un tiempo de 40 minutos, siendo éste de 34% en peso; esto debido a las altas condiciones energéticas que se imprimen en el proceso de entrecruzamiento, que dan como producto un hidrogel más consistente de alta adherencia, resultando en una rapidez de absorción de 0.018%/min.

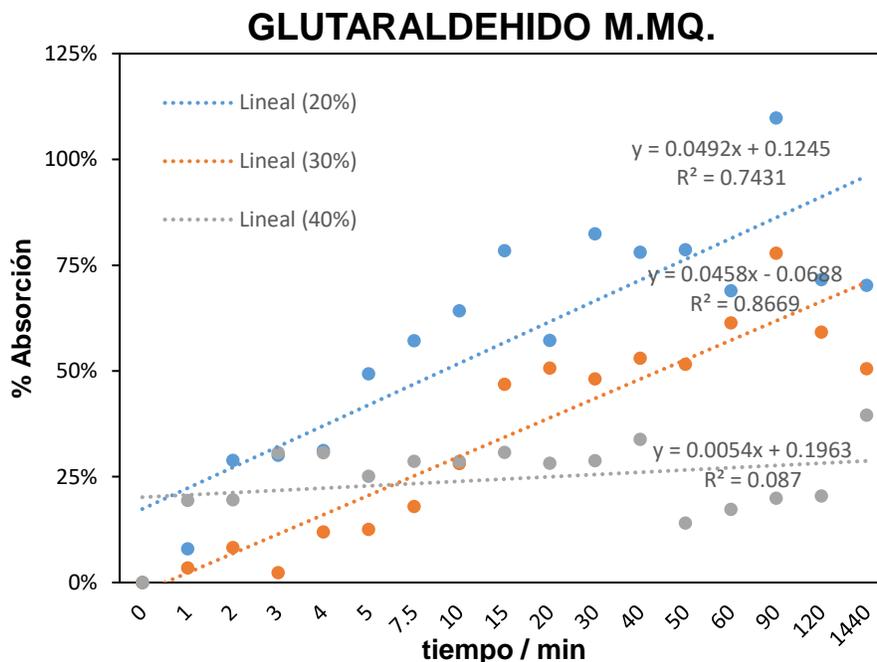


Figura 1.62. Absorción de agua de hidrogeles de Q-GTR al 20% (azul), 30% (naranja) y 40% (gris) en atmósferas con humedad relativa controlada.

Los hidrogeles de quitosano entrecruzados con glutaraldehído por mecanosíntesis al 20, 30 y 40% presentan un porcentaje de agua absorbida relativamente alto llegando a sus máximos valores de absorción a un tiempo de 90, 90 y 1440 minutos, respectivamente. En los hidrogeles de Q-GTR entrecruzado al 20%, el contenido de agua absorbida es mayor, siendo éste de 109.7% en comparación con el de 30 y 40% llegando a un máximo de absorción de sólo 77.8 y 39.55% en peso. Esta mejora es atribuida a la mayor longitud de la cadena del glutaraldehído que repercute en la absorción de agua; no obstante, la tendencia observada en las curvas es semejante, llegando a rapidez de absorción de 0.05, 0.045 y 0.0054%/min para hidrogeles de Q-GTR entrecruzados al 20, 30 y 40%, respectivamente.

8.2.3.4.- DETERMINACIÓN DE ADHERENCIA

De igual manera se realizaron las pruebas de adherencia en un dispositivo de elongación manual adaptado a una báscula digital, con el fin de identificar el esfuerzo de ruptura del polímero soportado en dos placas de cristal. Cuyos resultados se presentan en las Figuras 1.63 para el Glioxal

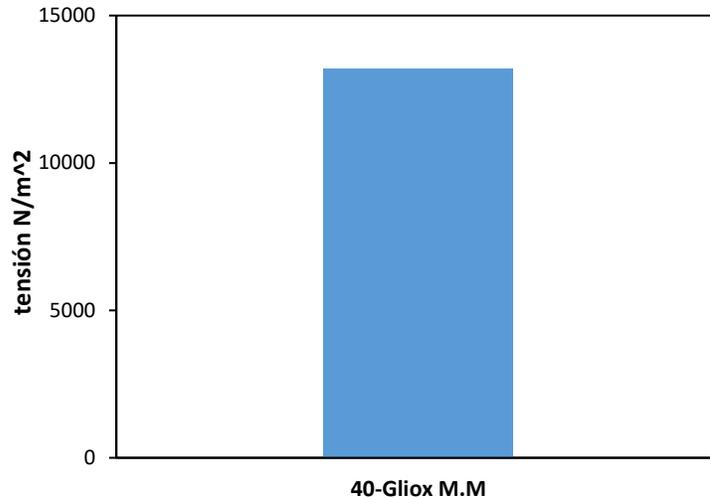


Figura 1.63. Esfuerzo de ruptura de Q-GXL al 40% de entrecruzante.

Para los hidrogel de quitosano sintetizados por mecano-síntesis únicamente se presentó adherencia en el compuesto de glioxal al 40% esto se atribuye al método de entrecruzamiento y a la cantidad de energía que se genera en la síntesis mediante el molino de alta energía, esto mejora en gran medida las propiedades mecánicas del gel resultante.

8.3.- CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO FUNCIONALIZADO

Existe un sinfín de materiales desarrollados partiendo de un polímero modificado químicamente mediante diferentes agentes de funcionalización buscando así mejorar sus propiedades fisicoquímicas. Recientemente, la búsqueda de polímeros *eco-friendly* y propiedades biocompatibles ha girado la mirada a compuestos a base de biopolímeros como el quitosano funcionalizado con aldehídos, debido a que se ha comprobado que la introducción de aldehído a la estructura del quitosano prestó la capacidad de auto-reticularse y formar un gel semisólido permitiendo el desarrollo de matrices de quitosano biocompatibles para la aplicación de administración de fármacos [113, 114, 115]. Al emplear agentes de tipo Aldehído como Piruvaldehído (metilglioxal) se logra ramificar la cadena del biopolímero obteniendo características que logren mejorar las propiedades del mismo.

Con el fin de determinar el efecto del agente funcionalizante metilglioxal, se realizó la caracterización química mediante Espectroscopía Infrarrojo por Transformada de

Fourier (FT-IR) de los polímeros, resultado de los procesos de funcionalización evaluando los métodos mecanoquímico y electroquímico.

8.3.1- DETERMINACIÓN QUÍMICA ESTRUCTURAL DE QUITOSANO FUNCIONALIZADO POR MÉTODO ELECTROQUÍMICO POR F-TIR

Se llevó a cabo la funcionalización de quitosano empleando un agente aldehído de tipo metil-glioxal para generar la modificación química del compuesto. Dicha característica se siguió mediante la técnica de caracterización de FT-IR como se presenta en la figura 1.64 donde se muestran los espectros característicos tanto de la cadena lineal (CH) como del agente funcionalizante (Py) y el producto generado (CH-Py).

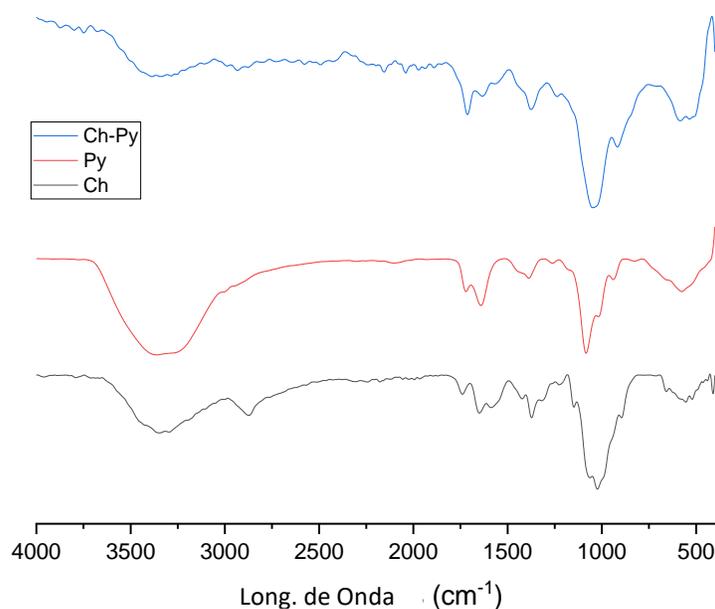


Figura 1.64. Espectro Infrarrojo de funcionalización electroquímica de quitosano (negro), Piruvaldehído (rojo) y Q-Py (azul).

En la figura 1.64 se pueden visualizar las bandas correspondientes a los espectros de quitosano puro, piruvaldehído puro y Ch-Py sintetizado por el método electroquímico. El espectro de quitosano puro presenta las bandas características de absorción a 1600 cm⁻¹ y 1650 cm⁻¹ que representan la flexión N-H de la amina primaria y el estiramiento N-H (amida II) respectivamente. El estiramiento C-N, y el estiramiento C = O de los grupos

N-acetilo residuales se representan mediante bandas a 1320, 1420 cm^{-1} , respectivamente. Además, una banda a 3550-3200 cm^{-1} representa la vibración de los grupos –OH. El espectro de Piruvaldehído puro muestra amplias bandas solapadas debidas a modos amplios que involucran vibraciones de estiramiento O–H y N–H en números de onda de 3000 a 3600 cm^{-1} . La intensidad de las bandas entre 1000 a 1100 cm^{-1} probablemente se deba a estiramientos de C–O, que se absorbe fuertemente en el IR. El origen del pico a 1260 cm^{-1} amplio puede ser un solapamiento de estiramientos debidos a los enlaces C – O y C–C, de igual manera, el estiramiento C=O alrededor de los 1420 cm^{-1} .

Por el contrario, el quitosano modificado con piruvaldehído muestra distintas variaciones tanto en la posición del pico como en la intensidad, lo que sugiere cambios en la estructura tras la modificación. Las bandas en 1600 y 1650 cm^{-1} se desplazan a 1643 y 1605 cm^{-1} . Las bandas de pico prominentes y anchas en el rango de 1605-1620 cm^{-1} indican un mayor contenido de estructura reticulada asociada al proceso de funcionalización, mientras que la aparición de una banda fuerte en el rango de 1670-1678 cm^{-1} corresponde a la presencia de ramificaciones aleatorias. Un pico a los 850 cm^{-1} se atribuye a la flexión fuera del plano de la formación anular del aminoácido resultado de la funcionalización; así mismo, un cambio similar tanto en la posición del pico como en la intensidad del quitosano modificada con piruvaldehído aparece en las bandas de amida II en la región entre 1500 y 1600 cm^{-1} . Y un pico prominente de carbonilo que se extiende a 1715 cm^{-1} .

8.3.2- DETERMINACIÓN QUÍMICA ESTRUCTURAL DE QUITOSANO FUNCIONALIZADO RESULTADO DE LA TÉCNICA DE MECANOSÍNTESIS POR F-TIR

En la figura 1.65 se pueden visualizar las bandas correspondientes a los espectros de quitosano puro, piruvaldehído puro (metilglioxal) y Ch-Py sintetizado por mecanosíntesis.

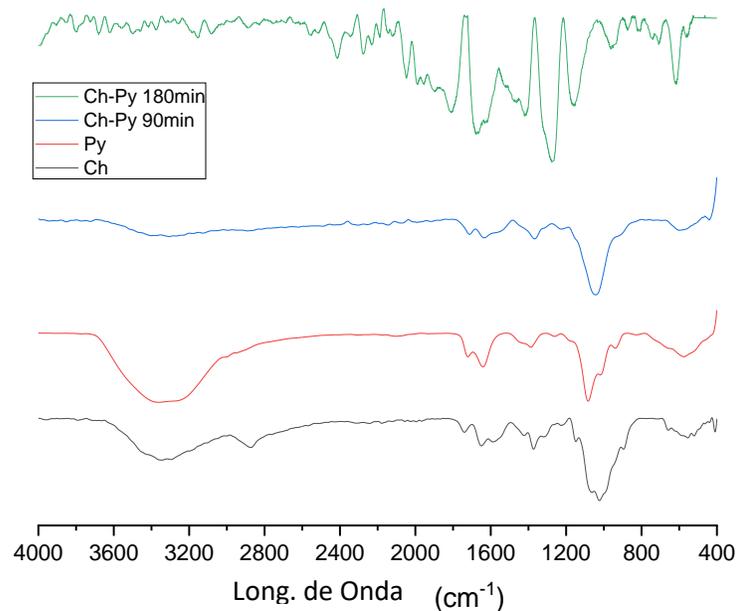


Figura 1.65. Espectro Infrarrojo de funcionalización por mecano-síntesis de quitosano (negro), Piruvaldehído (rojo), Q-Py a 90 min (azul) y Q-Py a 180 min (verde).

Para el proceso de funcionalización por mecano-síntesis se puede evaluar la diferencia entre los espectros de IR de los productos de las síntesis mecanoquímica y electroquímica en las Figuras 1.64 y 1.65, lo que indica que los mecanismos observados no son los mismos para los dos métodos de funcionalización. En la figura 1.65 se muestran los cambios espectrales asociados a la ausencia del pico a los 850 cm^{-1} atribuido a la funcionalización; así mismo, la reducción de las bandas solapadas en estiramiento O-H y N-H en números de onda de 3000 a 3600 cm^{-1} , una característica a resaltar es la agudeza del pico a 1025 cm^{-1} que se atribuye a estiramientos de tipo C-N. En general, se puede asociar el método de síntesis principalmente con el grado de funcionalización ligado a la reticulación de la cadena de quitosano.

IX.- CONCLUSIONES

Quitina y quitosano fueron obtenidos satisfactoriamente mediante los métodos químico heterogéneo, electrólisis forzada e hidrólisis ácida. Dichos resultados fueron elucidados mediante la caracterización por espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), donde se identificaron las bandas características de la transformación de quitina a quitosano a 1600 y 3200 cm^{-1} . De igual forma mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) se evaluó la morfología de la quitina-alfa y quitosano, encontrando una retención del pigmento debida a fibras de 1 μm de diámetro que se ubican entre láminas. Adicionalmente, por Difracción de Rayos X (DRX) se indexaron los picos característicos de la estructura quitina- α que estuvo sometida a procesos de desacetilación, mostrando una disminución en la intensidad del pico y un aumento del ancho de pico atribuido a la formación de quitosano

El método de síntesis químico de quitosano presentó un rendimiento del 3.6 % a partir de la cáscara de camarón, empleando una alta concentración de agentes alcalinos (4M NaOH) acompañado de altas condiciones de presión y temperatura (121°C y 15 lb) por un tiempo de 1 hora, generando quitosano con diferente peso molecular y grado de desacetilación, predominando una fase alfa de quitina entre los subproductos.

El método de electrólisis forzada presentó un rendimiento similar del 3.56 % a partir de la cáscara de camarón empleando concentraciones bajas de soluciones ácidas (Ac. acético 0.3N), así como una desacetilación empleando un sistema electroquímico, logrando la precipitación del quitosano mediante la adición de NaOH a pH mayores a 6. El quitosano producto de este método resultó en un peso molecular y grado de desacetilación variable, así como una predominante fase alfa de quitina dentro de los productos obtenidos.

El método electroquímico presentó un rendimiento del 9.8 % a partir de la cáscara de camarón empleando bajas concentraciones de soluciones ácidas (Ac. acético 0.3N), así como una desacetilación empleando un sistema electroquímico horizontal y experimentos por lotes de 30 minutos, logrando el depósito del quitosano como producto de este método.

Mediante estudios voltamperométricos se logró identificar la importancia de los procesos catódicos, así como localizar potenciales de reacción óptimos alrededor de los -1 y -1.6V donde se generan las etapas de nucleación y proliferación de la capa de quitosano en el sustrato metálico. De igual manera se identificaron las condiciones energéticas límites del proceso, hacia reducción en potencial de -0.5V y la meseta más prolongada entre los potenciales -0.6 y -1.6V.

Con ayuda de la ecuación de Mark Houwink se logró determinar el peso molecular promedio viscoso del polímero, obteniendo un valor de 1,837,758.324 g/mol para el quitosano producto del proceso electroquímico.

Los estudios de espectroscopía de impedancia electroquímica permitieron determinar que el comportamiento del depósito de quitosano obedece a la representación del circuito equivalente propuesta por *Randles*, donde las interacciones de tipo ion-dipolo se atribuyeron a reacciones no espontáneas, debido a la relación química-electroquímica del proceso.

Estudios posteriores sugieren tiempo de experimentación alrededor de 12 h de contacto entre la cáscara de camarón y el ácido acético para lograr un mejor grado de desproteinización y el diseño de una celda de multielectrodos para generar un mejor rendimiento del depósito.

Por otra parte, se realizó un entrecruzamiento químico de quitosano con agentes de tipo dicarbonílico (GXL y GTA) identificando mediante técnicas de caracterización de FT-IR la banda característica de la reticulación química a 1572 cm^{-1} . Así mismo, se logró identificar mediante DRX un ensanchamiento en el pico de difracción debido a la modificación estructural del quitosano.

Se realizó con éxito el mismo proceso de gelación química mediante un arreglo electroquímico de dos electrodos en una celda horizontal; evidenciando mediante técnicas de voltamperometría cíclica y lineal que el proceso identificado por método electroquímico se considera químico–electroquímico asistido a la evolución de

hidrógeno debido a la liberación y disposición de los iones hidronio que favorece la reacción de depósito en la superficie del cátodo.

Gracias a la caracterización electroquímica de los productos entrecruzados se identificó la frecuencia del proceso alrededor de los 1.3Hz donde las condiciones se ven favorecidas energéticamente para el depósito de quitosano en el área electroactiva.

De igual manera se realizó un proceso con éxito de entrecruzamiento químico mediante mecano-síntesis en ausencia de solventes obteniendo un resultado positivo y favoreciendo la optimización del reactivo, esto debido a que se ve eliminada la etapa de purificación del hidrogel resultante, evitando significativamente pérdidas debidas a este proceso. Por otra parte, contrario a esta ventaja se encontró que dicha reacción solo se ve favorecida en concentraciones altas de reticulante, resultando en una solución de alta solubilidad y baja viscosidad para concentraciones por debajo de 40% esto se atribuye a la fuerza de reacción que proporciona el método de entrecruzamiento que a bajas concentraciones destruye la estructura resultante quedando como una solución de quitosano.

Se realizaron pruebas de adherencia para los productos de Q-GXL y Q-GTA sintetizados por los tres métodos, químico, electroquímico y mecanoquímico; en cuyo caso los productos obtenidos por procesos mecánicos tuvieron una mejor adherencia siendo esta de 13,187.8 N/m² para el Q-GXL al 40% aunado a esto se identificó que el producto de Q-GTR a la misma concentración presentó una nula adherencia debida a su alta solubilidad.

De igual manera se realizaron pruebas de absorción en agua resultando con mejor absorción los productos de entrecruzamiento químico con GXL al 40% y 30% con un 1.6 y 0.7 mg/min respectivamente, presentando mucha similitud en los resultados de los métodos electroquímicos y mecanoquímicos oscilantes entre valores de 0.1 a 0.3 mg/min.

Se logró la funcionalización química del quitosano mediante las técnicas de mecano-síntesis y electroquímicas con un aldehído de tipo Piruvaldehído (metilglioxal).

Así mismo, se identificó la relación del método de síntesis con el grado de funcionalización del compuesto resultante.

X.- PRODUCTOS

- Se obtuvo satisfactoriamente biomateriales a partir de tres técnicas de síntesis de biomateriales; entrecruzamiento y funcionalización de quitosano por método químico convencional, mecanoquímica y/o electroquímica, evaluando variables que influyen en sus propiedades.
- Se generaron propiedades atractivas para potencial aplicación dentro del campo de la ingeniería tisular como andamios para la regeneración de tejidos, en cuyo caso se requiere complementar estudios bioquímicos especializados de soporte de fármacos y enzimas *in vivo*.
- Se desarrolló una tesis de grado de Doctorado.
- Se logró la publicación del artículo “Mechanosynthesis of high molecular weight fluorescent derivatives of chitosan, linear and non-linear optical characterization” en el área de polímeros en Journal of Polymer Research (DOI:<https://doi.org/10.1007/s10965-021-02703-x>).
- Se elaboró la solicitud de registro de patente de un método de síntesis de quitosano a partir de la cáscara de camarón por técnicas electroquímicas donde se pretende complementar con la parte de inventiva y diseño creativo de equipos de proceso.

XI.- REFERENCIAS

- [1] Instituto Nacional de Bioingeniería e Imágenes Biomédicas, «Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa,» *Instituto Nacional de Bioingeniería e Imágenes Biomédicas*, 2013.
- [2] M. A. Lizarbe, «Sustitutivos de Tejidos: De los biomateriales a la ingeniería tisular,» *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, vol. 101, nº 1, pp. 227-249, 2007.
- [3] G. F. Falke y A. Atala, «Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular,» *Archivo Argentino Pediatrico*, vol. 98, nº 2, pp. 103-115, 2000.
- [4] F. Forriol Brocal, «Ingeniería tisular en el Cartílago Articular: Estudio in Vivo del proceso de regeneración mediante Scaffolds bioestables,» Universitat de València, València, 2010.
- [5] A. Flóres Cabrera, M. I. González Duque y M. R Fontanilla, «Terapias Celulares y Productos de Ingeniería de Tejidos para el Tratamiento de Lesiones Condrales de Rodilla,» vol. XIX, nº 2, 2017.
- [6] D. W. Hutmacher, «Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage,» *Biomaterials*, vol. 21, nº 1, pp. 2529-2543, 2000.
- [7] H. Yoshimoto, Y.M. Shin, H. Terai y J.P. Vacanti, «A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering,» *Biomaterials* , vol. 24 , nº 1, p. 2077–2082, 2003.
- [8] I. M. Fuentes Boquetea, M. d. C. Arufe Gondaa, S. M. Díaz Pradao, T. H. Gómez, F. J. de Toro Santosa y F. J. Blanco García, «Tratamiento de lesiones del cartílago articular con terapia celular,» vol. 3, nº 3, 2007.
- [9] Tiantian Wu, Jiaqi Huang, Yangyang Jiang, Yaqin Hu, Xingqian Ye, Donghong Liu y Jianchu Chen, Formation of hydrogels based 1 on chitosan/alginate for the delivery of lysozyme and their antibacterial activity, China: Food Chemistry , 2017.
- [10] G. Scionti, «Evaluación de las Propiedades Biomecánicas de tejidos artificiales elaborados con biopolímeros para su utilización en ingeniería tisular,» Universidad de Granada, 2014.
- [11] A. J. Chato, Carriel V, D. Herrera D, O. Garcia Garcia, D. Sanches Porras, M. Diaz Ramos, V. Albaladejo Garcia , L. A. Irastorza , Campos F y Garzon I, «Hidrogeles de gelatina entrecruzados para aplicaciones en ingeniería tisular,» *Actualidad Medica*, vol. 803, nº 103, pp. 9-12, 2018.

-
- [12] L. E. Freed, G. Vunjak Novakovic, R. J. Biron, D. B. Eagles, D. C. Lesnoy, S. K. Barlow y R. Langer, «Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering,» *Nature biotechnology*, vol. 12, nº 1, pp. 689-693, 1994.
- [13] C. Lárez Velásquez, «Quitina y Quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro,» vol. 2, nº 1, 2006.
- [14] H. Peniche Agüero, L. D. C. Peniche Covas y A. Osorio Madrazo, «Fibras de quitosana-BSA bioinspiradas para aplicaciones en ingeniería de tejido del anillo fibroso de los discos intervertebrales,» *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, vol. 36, nº 1, 2017.
- [15] A. Martínez Camacho, F. Rodríguez Félix, M. Cortez Rocha, P. Herrera Franco, S. Andrade Canto y M. Placencia Jatomea, «Bionanofibras de Quitosano y ácido poliláctico: Estudio y efecto sobre el crecimiento de *Aspergillus niger*,» *Simposio Iberoamericano de Quitina*, vol. VII, nº 1, p. 65, 2015.
- [16] R. Rosales Ibañez, K. N. Alvarado Estrada y F. Ojeda Gutiérrez, «Ingeniería Tisular en Odontología,» *Revista de la Asociación Dental Mexicana*, vol. LXIX, nº 4, pp. 164-167, 2012.
- [17] R. M. Nerem y A. Sambanis, «Tissue Engineering: From Biology to Biological Substitutes,» *Tissue Engineering*, vol. 1, nº 1, pp. 3-13, 1995.
- [18] J. M. Callén Palacio y R. Bragós Bardia, *Sistemas de estimulación mecánica y caracterización de polímeros para Ingeniería Tisular*, Barcelona: Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Telecomunicación de Barcelona, 2009.
- [19] D. A. Campos Muñoz y J. Sanz Esponera, *Cuerpo, Histología y Medicina. De la Descripción Microscópica a la Ingeniería Tisular*, España: Instituto de España, 2004.
- [20] K. Valbuena Reyes, B. M. Vallejo Díaz y C. J. Cortés Rodríguez, «Estudio de la Cinética de Degradación Bajo Carga Mecánica de un Polímero Implantable,» Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2018.
- [21] G. Duffo, *Materiales y materias primas*, Buenos Aires: Ministerio de Educación, 2011.
- [22] S. Yang, K.-F. Leong y Z. Du, «The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors,» *Tissue Engineering*, vol. 7, nº 6, pp. 679-689, 2001.
- [23] Joon Park y R.S. Lakes, *Biomaterials: An Introduction*, New York: Springer Science & Business Media, 2007.

-
- [24] A. González Jiménez, M. A. Malmierca, P. Posadas Bernal, Á. M. Fernández, A. Rodríguez Díaz y J. López Valentín, «Biomateriales elastoméricos en ingeniería tisular,» *Revista de Plásticos Modernos*, vol. 107, nº 690, pp. 21-24, 2014.
- [25] Time, *Special Report. The hottest jobs of the future.*, New York: Time, Mayo 2000.
- [26] B. Interviewee, *Spare body parts*. [Entrevista]. 15 Mayo 2000.
- [27] *The Economist*. [Entrevista]. 1 Febrero 2003.
- [28] M. J. Lysaght y A. L. Hazlehurst, «Tissue Engineering: The End of the Beginning,» *Tissue Engineering*, vol. 10, nº 1/2, pp. 309-320, 2004.
- [29] Ramalingam Murugan y Seeram Ramakrishna, «Design Strategies of Tissue Engineering Scaffolds with Controlled Fiber Orientation,» *Tissue Engineering*, vol. 13, nº 8, pp. 1845-1866, 2007.
- [30] P. Hernández Ramírez, «Medicina regenerativa y células madre. Mecanismos de acción de las células madre adultas,» *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Medicina Transfusional*, vol. 25, nº 1, pp. 1-15, 2009.
- [31] C. Fabres V., «Técnicas del Futuro: Ingeniería de Tejidos y uso de Células Madres en Medicina Reproductiva,» *Revista Médica Clínica Las Condes*, vol. 21, nº 3, pp. 488-493, 2010.
- [32] C. Nombela Cano y C. S. Vallés, *Células madre*, CSIC - CSIC Press, 2010.
- [33] S. F. Gilbert, *Biología del desarrollo*, Uruguay: Médica Panamericana, 2005.
- [34] C. Belart Rodríguez, *Biología y Geología*, EDITEX, 2008.
- [35] D. Morales Navarro, «Ingeniería tisular como puntal de la medicina regenerativa en estomatología,» *Revista Cubana de Estomatología*, vol. 51, nº 3, pp. 288-304, 2014.
- [36] M. Vallet, «Tendencias en Biomateriales,» de *Plataforma de Debates*, 2010.
- [37] D. Serrato Ochoa, R. Nieto Aguilar y A. Aguilera Méndez, «Ingeniería de tejidos. Una nueva disciplina en medicina regenerativa,» *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, vol. I, nº 64, pp. 61-69, 2015.
- [38] S. Roldán, C. A. Vargas, M. L. Mejía, J. Zapata y M. E. Moncade, *Ingeniería de Tejidos y Aplicación*, Colombia: Instituto Tecnológico Metropolitano, 2016.

-
- [39] S. Vaqué Aura, G. Gallego Ferrer y J. Ródenas Rochina, Síntesis y caracterización de hidrogeles modificados para regeneración de piel, València: Universidad Politécnica de València, 2017.
- [40] V. Cardona Trujillo, B. C. Padilla Quintero, W. H. Lizcano Valbuena y A. F. Rodríguez Marmolejo, «Preparación y caracterización fisicoquímica y estructural de un gel conductor a base de quitosano,» Universidad del Valle, Santiago de Cali, 2012.
- [41] A. Sanchez Brenes, M. Sibaja B., J. Vega Baudrit y S. Madrigal C., «Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido del camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) con potenciales aplicaciones biomedicas,» vol. 8, nº 4, 2007.
- [42] N. Rodríguez Hamamura, A. Valderrama Negrón, H. Alarcón Cavero y A. López Milla, «Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol,» vol. 76, nº 4, 2010.
- [43] E. L. Romero Peñaloza, Obtención de hidrogeles de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger* y su estudio en la liberación controlada de cefalexina, Santiago de Cali: Facultad de ciencias naturales y exactas, 2011.
- [44] O. E. Cárdenas Soriano, L. G. Parada Gómez y G. Díaz Crespín, «Caracterización de los productos de la desacetilación selectiva de quitina,» Universidad del Salvador, San Salvador, 2010.
- [45] Arguelles W. , «Estudio de tres propiedades básicas de la quitosana: formación de películas, obtención de complejos polielectrolitos y adsorción de mercurio.,» Universidad de La Habana, La Habana, Cuba, 1994.
- [46] S. V. Nemtsev, A. I. Gamzazade, S. V. Rogozhin, V. M. Bykova y V. P. Bykov, «Deacetylation of Chitin under Homogeneous Conditions,» *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 38, nº 6, p. 521–526, 2002.
- [47] Józef Synowiecki y Nadia Ali Al-Khateeb , «Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives.,» *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 43, nº 2, pp. 145-171, 2003.
- [48] P. Binod, C. Sandhya, P. Suma, George Szakacs y Ashok Pandey, «Fungal biosynthesis of endochitinase and chitobiase in solid state fermentation and their application for the production of N-acetyl-d-glucosamine from colloidal chitin,» *Bioresource Technology*, vol. 98, nº 14, pp. 2742-2748, 2007.

-
- [49] A. P. Ramos Puebla, C. K. Shirai Matsumoto, C. P. Larralde Corona y Laurent David, «Producción de quitina desacetilasa fúngicas y su aplicación en la desacetilación de biopolímeros,» Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F., 2016.
- [50] R. G. Sánchez Duarte, M. d. R. Martínez Macías, M. A. Correa Murrieta, J. Saldívar Cabrales, D. I. Sánchez Manchado y J. López Cervantes, «Síntesis de hidrogeles de quitosano a partir de cáscara de camarón para ensayos de adsorción de cobre,» vol. 33, 2016.
- [51] A. Sánchez Brenes, M. Rojas Chávez y S. Madrigal Carballo, Caracterización y utilización de hidrogeles de quitosano obtenidos a partir de camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) para el crecimiento de fibroblastos humanos., Cartago, Costa Rica: Instituto Tecnológico de Costa Rica, 2006.
- [52] C. Mendoza Barrera, L. Bahena Navarro, M. A. Meléndez Lira y C. Velasquillo, «Diseño, construcción y aplicación de un sistema de electrodeposición química: películas de quitosano sobre acero inoxidable,» *Revista Mexicana de Física E*, vol. 52, nº 2, pp. 244-250, 2006.
- [53] C. González, A. Valbuena, B. Celis, L. Perentena y M. Colina, «Degradación oxidativa de quitosano con peróxido de hidrógeno,» *Revista Iberoamericana de Polímeros*, vol. 16, nº 1, pp. 43-68, 2015.
- [54] T. Yawo Kuo, C. I Tzu y P. Chieh Chung, «Preparation of novel chitosan scaffolds by electrochemical process,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 62, nº 1, pp. 113-119, 2005.
- [55] F. J. Sánchez, N. Rosa M., H. Díaz de Apodaca y I. A. Katime, «Hidrogeles derivados del Ácido Itacónico,» 1995.
- [56] I. A. Katime, O. Katime y D. Katime, «Materiales Inteligentes: Hidrogeles macromoleculares, algunas aplicaciones biomédicas,» 2014.
- [57] J. A. Alvarado Santiago, C. R. Rendón del Valle,, A. Ramírez Sosa, S. Rivadeneyra Castillo y M. E. Hernández Moreno, «Hidrogel: Potenciador reservorio del agua y sus usos en la agricultura,» 2010.
- [58] Y. S. Zhang y A. Khademhosseini, «Advances in engineering hydrogels,» vol. 356, 2017.
- [59] A. Arredondo Peñaranda y M. E. Londoño López, «Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos,» vol. 3, nº 5, 2009.
- [60] Faisal Raza, Hajra Zafar, Ying Zhu, Yuan Ren, Aftab -Ullah, K. Asif Ullah, Xinyi He, Han Han, Md Aquib, B.-Y. Kofi Oti y Liang Ge, «A Review on Recent Advances in Stabilizing Peptides/Proteins upon Fabrication in Hydrogels from Biodegradable Polymers,» vol. 10, nº 16, 2018.

-
- [61] J. Escobar, D. García, D. Zaldivar y I. Katime, «Hidrogeles. Principales características en el sistema de liberación controlada de fármacos,» vol. 3, nº 3, 2002.
- [62] A. S. Hoffman, «Hydrogels for biomedical applications,» vol. 64, nº 18-23, 2012.
- [63] D. Andrade, D. García, H. Inciarte, I. González, D. Soto y H. Oliva, «Síntesis y caracterización de hidrogeles basados en acrilamida y ácido maleico,» vol. XI, nº 1, 2010.
- [64] R. F. Estrada Guerrero, D. Lemus Torres, D. Mendoza Anaya y V. Rodríguez Lugo, «Hidrogeles biopoliméricos potencialmente aplicables en agricultura,» vol. XII, nº 2, 2010.
- [65] Maryam Dargahi, Hossein Ghasemzadeh y Atefeh, «Highly efficient absorption of cationic dyes by nano composite hydrogels based on k-carrageenan and nano silver chloride,» vol. 17, 2017.
- [66] Hyun-Joong Chung, Hemant Charaya, Li Liu y Xinda Li, «Tough Hydrogels: Toughening Mechanisms and Their Utilization in Stretchable Electronics and in Regenerative Medicines,» vol. 12, nº 1, 2018.
- [67] Kuen Yong Lee y D. J. Mooney, «Hydrogels for Tissue Engineering,» vol. 101, nº 7, 2001.
- [68] M. G. De Souza Affidi, B. Rojas de Gáscue, A. Ramírez, J. L. Prin y A. Müller, «Morfología porosa de redes poliméricas interpenetradas de doble red de acrilamida con capacidad absorbente de saliva artificial,» vol. 24, 2015.
- [69] C. Chi Lin y K. S. Anseth, «PEG Hydrogels for the Controlled Release of Biomolecules in Regenerative,» vol. XXVI, nº 3, 2009.
- [70] D. H. Lorenz y B. Ridge, «Skin Adhesive Hydrogel, Its preparation and uses». United States Patente 5,306,504, 29 April 1994.
- [71] J. L. Drury y D. J. Mooney, «Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications,» vol. 23, 2003.
- [72] Yoshihiko Murakami, Masayuki Yokoyama, Teruo Okano, Hiroshi Nishida, Yasuko Tomizawa, Masahiro Endo y Hiromi Kurosawa, «A novel synthetic tissue-adhesive hydrogel using a crosslinkable polymeric micelle,» vol. 3, nº A, 2006.
- [73] B. Sharma, S. Fermanian, M. Gibson, S. Unterman, D. A. Herzka, B. Cascio, J. Coburn, A. Y. Hui, N. Marcus, G. E. Gold y J. H. Elisseeff, «Human Cartilage Repair with a Photoreactive Adhesive-Hydrogel Composite,» vol. 5, nº 167, 2013.

-
- [74] Bum Jin Kim, Dongyeop X. Oh, Sangsik Kim, Jeong Hyun Seo, Dong Soo Hwang, Admir Masic, Dong Keun Han y Hyung Joon Cha, «Mussel-Mimetic Protein-Based Adhesive Hydrogel,» vol. 15, 2014.
- [75] V. H. M. Mouser, N. M. M. Dautzenberg, R. Levato, M. H. P. van Rijen, W. J. A. Dhert, J. Malda y D. Gawlitta, «Ex Vivo Model Unravelling Cell Distribution Effect in Hydrogels for Cartilage Repair,» vol. 35, nº 1, 2017.
- [76] Feifei Xin, Qingliang Lu, Bingxin Liu, Shichao Yuan, Ruling Zhang, Yumin Wu y Yueqin Yu, «Metal-ion-mediated hydrogels with thermo-responsiveness for smart windows,» vol. 99, 2018.
- [77] Gudrun Schmidt, Bruce R. Hamaker y Jonathan J. Wilker, «High Strength Adhesives from Catechol Cross-Linking of Zein Protein and Plant Phenolics,» nº 1700159, 2018.
- [78] S. Quintanilla Cavia y F. M. Pérez Campo, «Aplicaciones de Células Madre Mesenquimales (MSCs) en la reparación y regeneración del tejido óseo,» Facultad de Medicina Universidad de Cantabria, Cantabria, 2017.
- [79] R. Miñana Prieto, «Nanosistemas avanzados para aplicaciones dermatológicas,» Universidad Autónoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallés, 2017.
- [80] C. Cardozo, M. Sabino, J. Ramírez, J. Rodríguez y M. Martínez, «Dispositivo para la obtención de nanofibras poliméricas por acción de fuerzas electrostáticas,» *II Congreso venezolano de redes y energía eléctrica*, vol. B3, nº 186, pp. 1-11, 2009.
- [81] C. Caicedo, A. M. Cerda, A. O. Orejarena, A. R. Vázquez y H. Maturana, «Obtención de nanofibras a base de Quitosano y PVA mediante la técnica de electrospinning,» *I Simposio de Materiales Poliméricos*, vol. 79, nº 2, pp. 43-45, 2015.
- [82] E. Hadipour-Goudarzi, M. Montazer, M. Latif y A. A. Ghare-Aghaji, «Electrospinning of chitosan/ sericin/PVA nanofibers incorporated with in situ synthesis of nano silver.,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 113, nº 231, 2014.
- [83] Kang H, Zhu Y, Jing Y, Yang X y Li C, «Fabrication and Electrochemical Property of Ag-Doped SiO₂ Nanostructured Ribbons,» *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, vol. 356, nº 120, 2010.
- [84] L. M. Duque Sánchez, L. Rodríguez y M. López, «Electrospinning: La era de las Nanofibras,» *Revista Iberoamericana de Polímeros*, vol. 14, nº 1, pp. 10-27, 2013.
- [85] E. D. Vargas Romero, Desarrollo y caracterización de recubrimientos activos a base de nanofibras electrohiladas de policaprolactona, quitosano y extractos oleosos de propóleos

colombianos para la conservación de filetes de lomo de cerdo., Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, 2020.

- [86] P. Cajero Vázquez, M. Meléndez Lira, M. Á. Camacho López, M. A. Castillo Rubí y F. R. González Díaz, «Armazones Celulares por la Técnica de Electrohilado,» *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, vol. 41, pp. 1-15, 2010.
- [87] W. Gamboa, O. Mantilla y V. Castillo, «Producción de Micro y Nano fibras apartir de la tecnica "Electrospinning" para aplicaciones Farmacológicas,» *VII Congreso de la sociedad cubana de Bioingeniería*, vol. 9, pp. 212-236, 2007.
- [88] Cabrera, L, Felix, M., V. Perez-Puyana y J. De la Fuente, «Desarrollo de Materiales Poliméricos porosos mediante Electrohilado,» *Universidad de Sevilla. Departamento de Ingeniería Química*, 2018.
- [89] Zonggang Chen , Xiumei Mo y Fengling Qing , «Electrospinning of collagen–chitosan complex,» *Materials Letters*, vol. 61, p. 3490–3494, 2007.
- [90] Homa Homayoni, Seyed Abdolkarim Hosseini Ravandi y Masoumeh Valizadeh, «Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 77, nº 3, pp. 656-661, 2009.
- [91] Á. P. Sánchez Cepeda, R. Vera-Graziano, E. d. J. Muñoz-Prieto, E. Y. Gómez-Pachón, M. J. Bernad-Bernad y A. Maciel-Cerda, «Preparation and Characterization of Electrospun Polymeric Membranes of Polycaprolactone and Chitosan for Controlled Release of Thiamine Chlorhydrate,» *Ciencia en Desarrollo*, vol. 7, nº 2, pp. 133-151, 2016.
- [92] Y. C. Cárdena-Pérez, R. Vera-Graziano, E. d. J. Muñoz-Prieto y E. Y. Gómez-Pachón, «Obtención y caracterización de andamios electrohilados a base de quitosano y fibroína del capullo (*Bombyx mori*),» *Ingeniería y Competitividad*, vol. 19, nº 1, pp. 134-146, 2017.
- [93] P. Calvo, C. Remuñan López, J. L. Vila Jato y M. J. Alonso, «Novel Hydrophilic Chitosan–Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 63, pp. 125-132, 1997.
- [94] A. Chávez Huerta, S. Acevedo, E. Luzardo, A. Valbuena y M. Colina, «Obtención y caracterización de quitosano entrecruzado con ácido cítrico,» *Revista iberoamericana de polimeros y materiales*, vol. 19, nº 5, pp. 227-235, 2018.
- [95] B. C. Padilla Quintero , V. Cardona Trujillo, G. Muñoz, W. H. Lizcano Valbuena, F. Zuluaga, A. F. Rodríguez Marmolejo y W. . L. Giraldo Parra, «Preparation and Characterization of Chitosan

Based Gels for Possible Biomedical Applications,» *Revista de Ciencias*, vol. 21, nº 1, pp. 91-99, 2017.

- [96] N. D. Montañez, M. Gelves, H. Estupiñán, C. Vázquez y D. Peña, «Evaluación de la adsorción de colágeno sobre matrices de PLA-PGA-biocerámicos-quitosano mediante espectroscopía de impedancia electroquímica.,» *Puente Revista Científica*, vol. 13, nº 4, pp. 28-32, 2011.
- [97] N. A. Pacheco Lopez, «Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: caracterización y aplicación,» de *Food and Nutrition*, España, Université Claude Bernard - Lyon I, 2010.
- [98] D. M. Escobar Sierra, C. P. Ossa Orozco, M. A. Quintana y W. . A. Ospina, «Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos.,» *Scientia et Technica*, vol. 18, nº 1, pp. 260-266, 2013.
- [99] J. Monter-Miranda, J. Tirado-Gallegos, P. Zamudio-Flores, C. Rios-Velasco, J. d. J. Ornelas-Paz, R. Salgado-Delgado, V. Espinosa-Solis y F. Hernández-Centeno, «Extracción y caracterización de propiedades fisicoquímicas, morfológicas y estructurales de quitina y quitosano de *Brachystola magna*,» *Revista Mexicana de Ingeniería química*, vol. 15, nº 3, pp. 749-761, 2016.
- [100] J. L. Cconislla Bello, C. J. I. Maza, M. Jahuirra, A. Pando, M. Holger y A. Valderrama, «Desarrollo de microparticulas de quitosano cuaternizado y entrecruzado para la adsorción de ácido desoxirribonucleico,» *Sociedad química de Perú*, vol. 82, nº 4, pp. 467-479, 2016.
- [101] L. G. Parada, G. D. Crespín, R. Miranda y I. Katime, «Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica,» *Revista Iberoamericana de Polímeros*, vol. 5, nº 1, pp. 1-16, 2004.
- [102] Katarzyna Lewandowska, «Viscometric Studies in Dilute Solution Mixtures of Chitosan and Microcrystalline Chitosan with Poly(vinyl alcohol),» *Journal of Solution Chemistry*, vol. 42, nº 8, pp. 1654-1662, 2013.
- [103] A. Freeman y Y. Dror , «Immobilization of "Disguised" Yeast in Chemically Crosslinked Chitosan Beads,» *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 44, nº 9, pp. 1083-1088, 1994.
- [104] K. C. Gupta y F. H. Jabrail, «Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman,» *Carbohydrate Research*, vol. 341, p. 744–756, 2006.
- [105] J. Z. Knaul, S. M. Hudson y . K. A. M. Creber, «Crosslinking of Chitosan Fibers with Dialdehydes:Proposal of a New Reaction Mechanism,» *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, vol. 37, pp. 1079-1094, 1999.

-
- [106] N. Santoni, M. Matos, C. Müller, H. Nicola, M. Sabino y A. Müller, «Caracterización de hidrogeles de quitosano entrecruzados covalentemente con genipina,» *Revista Iberoamericana de Polímeros*, vol. 9, nº 3, pp. 326-330, 2008.
- [107] Bin Li, Chang-Lin Shan, Qing Zhou, Yuan Fang, Yang-Li Wang, Fei Xu, Li-Rong Han, Muhammad Ibrahim, Long-Biao Guo, Guan-Lin Xie y Guo-Chang Sun, «Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Cross-Linked Chitosan-Glutaraldehyde,» *Marine Drugs*, vol. 11, pp. 1534-1552, 2013.
- [108] Allen J. Bard y Larry R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Texas: Wiley, 2000.
- [109] Conde, A. y J. J. Damborenea, «Corrosión de la aleación 8090 en medios salinos de agresividad moderada,» *Revista de metalurgia*, vol. 34, pp. 75-78, 1998.
- [110] S. González y R. M. Souto, «Investigación del comportamiento anticorrosivo de sustratos metálicos protegidos con recubrimientos orgánicos por medio de impedancia electroquímica,» *Materiales y Procesos Electrónicos*, vol. I, pp. 85-130, 2002.
- [111] F. Mansfeld, M. W. Kendig y S. Tsai, «Evaluation of Corrosion Behavior of Coated Metals with AC Impedance Measurements,» *CORROSION*, vol. 38, nº 9, pp. 478-485, 1982.
- [112] F. Mansfeld, «Use of electrochemical impedance spectroscopy for the study of corrosion protection by polymer coatings,» *Journal of Applied Electrochemistry*, vol. 39, p. 187–202, 1995.
- [113] Alper Omer Yasar y Ismet Kaya, «A cross-linker containing aldehyde functionalized ionic liquid for chitosan,» *Macromolecular Science*, vol. 56, nº 9, pp. 860-870, 23 Julio 2019.
- [114] E. P. Azevedo y Vijay Kumar, «Rheological, water uptake and controlled release properties of a novel self-gelling aldehyde functionalized chitosan,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 90, p. 894–900, 2012.
- [115] Jamal Chabbi, Abdelhafid Aqil, N. Katir, B. Vertruyen, C. Jérôme, M. Lahcini y A. El Kadib, «Aldehyde-conjugated chitosan-graphene oxide glucodynamers: Ternary cooperative assembly and controlled chemical release,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 230, pp. 1-19, 2020.