



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

“FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TERMOGELES DE
QUITOSÁN/ β -GLICEROFOSFATO DE SODIO Y QUITOSÁN
ALCOHOL POLIVINÍLICO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Q U Í M I C A

PRESENTA:

AIME CEDILLO VALLEJO

Y

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

I N G E N I E R A Q U Í M I C A

PRESENTA:

NANCY REBECA MARTÍNEZ CASTELLANOS

ASESORAS: DR. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO
DR. MA. EUGENIA RAMÍREZ ORTIZ.

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Formación y caracterización de termogeles de quitosán/B-glicerofosfato de sodio y quitosán-alcohol polivinílico.

Que presenta la pasante Aime Cedillo Vallejo

Con número de cuenta: 09608159-0 para obtener el título de:

Química

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

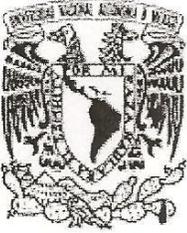
ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”

Cuautitlan Izcalli, Mex. a 26 de Octubre de 2010

PRESIDENTE IQ. Guadalupe Franco Rodríguez
 VOCAL Dra. Susana Patricia Miranda Castro
 SECRETARIO MC. Ofelia Vega Vázquez
 1er SUPLENTE MC. Ma. del Rosario Rodríguez Hidalgo
 2º SUPLENTE Dra. Abigail Martínez Estrada

[Firma]
[Firma]
 Ofelia Vega V.
[Firma]
 A.M.E.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN
 ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Formación y caracterización de termogeles de quitosán/B-glicerofosfato de sodio y quitosán-alcohol polivinílico.

Que presenta la pasante Nancy Rebeca Martínez Castellanos

Con número de cuenta: 09719681-1 para obtener el título de:
Ingeniera Química

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
 Cuautitlan Izcalli, Mex. a 26 de Octubre de 2010

PRESIDENTE IQ. Guadalupe Franco Rodríguez
 VOCAL Dra. Susana Patricia Miranda Castro
 SECRETARIO MC. Ofelia Vega Vázquez
 1er SUPLENTE MC. Ma. del Rosario Rodríguez Hidalgo
 2º SUPLENTE Dra. Abigail Martínez Estrada

Ofelia Vega V.

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA de MÉXICO

la Máxima Casa de Estudios, por darnos el honor y privilegio de pertenecer a ella.

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Por habernos dado la oportunidad de formarnos en sus aulas no solo como profesionistas sino como seres humanos.

A nuestra asesora Dra. Susana Patricia Miranda Castro agradecemos la confianza depositada en nosotras para la realización de este proyecto, así como la paciencia y guía que nos brindo para poder ver culminado este importante proyecto, gracias por su calidad humana y apoyo constante.

A nuestra asesora Dra. Ma. Eugenia Ramírez Ortiz agradecemos su valiosa ayuda en la elaboración de este proyecto, por sus consejos en cada paso que dimos, por las sonrisas y ayuda incondicional, por sus palabras de aliento cuando más las necesitábamos. Gracias por todo.

Al Laboratorio de Microscopía Electrónica por el apoyo brindado para la toma de las micrografías de este trabajo de tesis en especial al Sr. Rodolfo Robles Gómez por el apoyo brindado.

AL LEM I ALIMENTOS por el apoyo brindado en la realización de este trabajo de tesis.

Al laboratorio de calorimetría por el apoyo brindado para el análisis de las muestras contribuyendo así a la realización de este trabajo de Tesis en especial al Dr. José Luis Arjona.

Al laboratorio de miocardio por el apoyo brindado en la realización de este trabajo en especial a la Dra Ma. Luisa Martínez Aguilar.

A nuestros sinodales I.Q. Guadalupe Franco, M.C. Ofelia Vega, M.C. Rosario Rodríguez Hidalgo, Dra. Abigail Estrada por su valioso tiempo en la revisión y corrección de este trabajo de Tesis

A todos nuestros profesores por brindarnos su dedicación y conocimiento en nuestro desarrollo profesional, por que poseen una de las profesiones más noble y significativas: el ser maestro.

Al taller de soplado de vidrio por las facilidades brindadas para la adaptación del material de laboratorio, en especial al Sr. Drausin.

Nancy y Aíme.

DEDICATORIAS

A Dios, porque eres mi luz y mi guía, por estar siempre en mi corazón ayudándome a ser mejor cada día y por darme la oportunidad de llegar a la culminación de este trabajo.

A mis Padres

Miguel Martínez y Cristina Castellanos no tengo palabras con que agradecer su tiempo y dedicación, gracias por darme la vida, por sacrificar muchas cosas por mí y mis hermanas, por enseñarme que las cosas hechas con amor y dedicación valen la pena, porque cada momento en el que estoy junto a ustedes aprendo más y más.

Este trabajo de tesis es también suyo porque gracias a su apoyo y consejo he podido culminarlo.

Doy gracias a Dios por la bendición más grande que me ha dado la cual es tenerlos a ustedes... como mis padres.

Los Amo

A mis hermanas Lidia y Carolina

Por ser mis incondicionales, por poner a prueba todas las habilidades de negociación y paciencia que conozco, por siempre estar a mi lado y ser mis cómplices en cada locura que emprendemos juntas, por ayudarme a realizar mis sueños, por todos los momentos alegres y tristes que hemos pasado, porque sin ustedes no me siento sola y sé que siempre estarán a mi lado.

A mis Amigas Deysí, Paty, Betty, Maribel, Gina, Aíme porque su amistad va más allá de un simple apoyo y compañía, por ser mi segunda familia. Por lo bueno y lo malo durante todo este tiempo, porque a pesar de ser tan diferentes somos tan parecidas, porque cada día que compartimos juntas aprendemos unas de otras, porque nuestra amistad sea eterna.

A la Banda Alterna (Darío, Andrés, Oscar, Oscar V. Bouchain, Miguel,) por hacer mi estancia en la universidad más agradable y por todos los momentos vividos, chicos en verdad los quiero.

A las chicas Anglo, Luisa, Ome, Eli, Gaby, Gris, Karina, Licelda, Mony por los momentos gratos que hemos pasado juntas.

A Cecilia por ser como mi hermana pequeña y por hacerme reír con cada una de tus locuras.

A todos aquellos que me han acompañado en cada etapa de mi vida, algunos están aun conmigo y otros en mis recuerdos y corazón. Dios los bendiga.

Nancy Rebeca

DEDICATORIAS

A NUESTRO PADRE DIOS

Gracias por la vida que me diste, por qué me has mostrado tu infinito amor en cada paso que doy, por qué me diste la fortaleza y el coraje para seguir adelante. Por poner en mi camino personas maravillosas. Por tantas bendiciones que me das día tras día y que inmerecidamente recibo....me has dado tanto que ni siquiera lo hubiera imaginado.

A MI MADRE LINA VALLEJO C.

por qué eres mi ejemplo de fortaleza, coraje y amor ante la vida, por los consejos, las risas y hasta los regaños que me das por qué me apoyas y me amas a cada paso que doy.....por amarme a pesar de todo lo vivido, por qué este logro también es tuyo.....simplemente gracias por ser mi madre.

A mi amado esposo y eterno compañero de vida VICTOR IVANN F. OSORNO C.

Por qué un día lluvioso me enseñaste lo que es el amor verdadero y fue una luz que ilumino todo mi ser.

Me has dado lo mejor de mi vida.....tu amor y nuestros hijos.

Por que juntos hemos luchado contra todo y contra todos, eres mi mejor amigo, mi complemento sin restarme libertad, mi cómplice en todo a pesar de los errores, mi consejero incansable, te has convertido en mi todo.

Por que pasamos de ser tú y yo a ser nuestra familia. Por qué cada día me recuerdas por qué me enamore de tí y veo que los años

solamente nos han fortalecido y unido más. Gracias amor mío por amarme por qué me gusta lo que soy cuando estoy contigo.

*A mi princesa de caramelo MILDRED ARACELI y mi príncipe azul
SERGIO IVANN.*

Gracias mis amores por llegar en el mejor momento de mi vida, por qué me dieron la dicha y privilegio de darlos a luz, son el regalo más hermoso que dios me dio, llegaron a darle un sentido a mi vida que jamás hubiera esperado, todos los días llenan mi vida de luz y amor, son la ternura con las manos llenas de chocolate, son la inocencia con la boquita llena de mango y la travesura con los cabellitos parados.

Por qué a través de ustedes veo que dios existe, que la vida es buena y que el amor tiene frutos maravillosos.....son un milagro en mi vida.

A mis hermanos Carlos, Oscar y Vanesa.

A ti por que más que mi hermano mayor eres un padre para mí, a ti por que siempre has tenido sabios consejos para mí y a ti por que con tu ternura enriqueces mi vida. Sin ustedes tres mi vida no sería tan plena.

A Regina Aguilar Vallejo.

Por qué has estado incondicionalmente conmigo siempre, por las carcajadas, la ayuda, tus consejos, por tus lágrimas en los momentos que la vida no ha sido tan buena. Te admiro, eres una gran mujer.

A mi ángel guardián Rita González

Por qué sus consejos son oro molido, su cariño es invaluable y por qué alegra mi vida con solo escuchar sus carcajadas. Gracias por su lealtad, que es el regalo más valioso que me da.

A mi hermana Evelyn Navarrete T.

Gracias por todas las aventuras recorridas, por que tuviste un plato de comida cuando peligro la vida de mi hija, por las muchas veces que hemos llorado juntas, por la confianza, por el cariño tan grande, la lealtad, por qué te has convertido indispensable en mi vida.

A Deisy Pérez C.

Gracias por el apoyo y cariño que siempre me has dado, por qué has estado en los peores momentos sin condiciones ni reclamos, por qué a pesar de todo seguimos juntas.

Gracias por qué estuviste junto a mí en la pena de una muerte, en la carencia, en la enfermedad y en el conflicto. Por que a pesar de la distancia siempre tuviste palabras de aliento y te sentía juntito a mí.

A Sandra Carlos M.

Gracias por qué en esa niña penosa encontré a una amiga incondicional, con la que he compartido lo mejor y lo peor de nuestras vidas. Te quiero, eres una amiga admirable.

A Georgina Paredes M.

Gracias por mostrarme que amiga es la que te enriquece con sus palabras, la que te hace crecer. Por tus palabras llenas de fortaleza y experiencia, tus consejos y por compartir tantas alegrías conmigo.

A Georgina Barradas

Gracias por enfrentarme con mis demonios internos y ayudarme a vencerlos, por abrir tu corazón y dejarme ver la gran mujer que eres.

A la generación de Química 27, Lourdes, David Z., Ariana, Martha, Norma, Carlos, Arturo, David G.

Por haber tenido el placer de conocerlos y descubrir en cada uno un gran ser humano y convertirnos en amigos entrañables, gracias por que me dieron los 5 años más divertidos de mi vida.

AIME

Í N D I C E

OBJETIVO GENERAL..... vi

OBJETIVOS PARTICULARES..... vi

INTRODUCCIÓN..... 1

CAPÍTULO I

1. ANTECEDENTES

1.1 Quitosán.

1.1.1 Características del quitosán..... 2

1.1.2 Propiedades del quitosán..... 4

1.1.2 Aplicaciones del quitosán..... 5

1.2 β -glicerofosfato y alcohol polivinílico.

1.2.1 Características de β -glicerofosfato de sodio..... 8

1.2.2 Características del alcohol polivinílico..... 9

1.3 Hidrogeles..... 11

1.3.1 Hidrogeles inteligentes..... 12

• Hidrogeles sensibles a la temperatura..... 13

• Hidrogeles sensibles al pH..... 14

1.3.2 Polímeros inteligentes..... 16

1.3.3 Hidrogeles de quitosán entrecruzados iónicamente..... 18

1.3.4 Hidrogeles formados por complejación polímero-polímero.. 19

1.3.5 Aplicaciones de los hidrogeles..... 20

1.4 Caracterización de termogeles.	
1.4.1 Análisis de perfil de textura (TPA).....	21
1.4.2 Microscopia de Barrido Electrónico (MEB).....	26
1.4.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	30
1.5 Degradación de biopolímeros.....	38

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

2.1 Cuadro metodológico.....	42
2.2 Metodología.....	43

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Termogeles obtenidos a diferentes pesos moleculares y concentraciones de quitosán.....	49
3.2 Caracterización de los termogeles de quitosán/ β -glicerofosfato y de quitosán- alcohol polivinílico.	
3.2.1 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	52
3.2.2 Análisis de Perfil de Textura (TPA).....	54
3.2.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	62
3.2.4 Biodegradación (seguimiento fotográfico).....	69
3.3 Implante medicinal de los termogeles de quitosán/ β -glicerofosfato y de quitosán/ alcohol polivinílico.....	71
3.4 DISCUSIÓN.....	74
4. CONCLUSIONES.....	82
5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	85

➤ ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁG.
1	Estructura molecular del quitosán	3
2	Estructura del quitano y quitosán.	3
3	Esquema general para el aprovechamiento de crustáceos en el desarrollo de aplicaciones a partir de sus subproductos quitina y quitosán.	6
4	Estructura química del β -glicerofosfato de sodio.	8
5	Estructura química del alcohol polivinílico.	9
6	Temperatura crítica superior y temperatura crítica inferior	14
7	Cambio de fase de hidrogeles y polímeros sensibles al pH y a la temperatura.	16
8	Curva representativa de un análisis de Perfil de Textura.	24
9	Microscopio electrónico de barrido.	26
10	Máquina ionizadora de oro para el recubrimiento de oro de las muestras.	27
11	Esquema de un microscopio electrónico de barrido.	28
12	Formación de la imagen de la muestra.	29
13	Esquema general de un calorímetro diferencial de barrido.	30
14	(I y II) muestras de recipientes abierto (III) muestras de charolas herméticas.	32
15	Sistemas de envasado de tipo abierto y sellado herméticamente.	33
16	Barrido con DSC característico para materiales poliméricos.	34
17	Transiciones térmicas representativas de los polímeros en un DSC.	36
18	Estructura química del sitio de lisis de la lisozima.	40
19	Micrografías de barrido electrónico de los termogeles de Qn/ β -GF y Qn-PVA al 2%(p/v) (a y b) a 45 (c y d); a 300x (e y f) a 1000x.	53
20	Texturómetro Lloyd TA 500.	55
21	Termogel de Qn/ β -GF sin degradar.	69
22	Termogel de Qn-PVA sin degradar	69
23,25,27	Degradación del Termogel de Qn/ β -GF.	69, 70
24,26,28	Degradación del termogel de Qn-PVA.	69, 70
29	Inyección el implante del termogel de Qn-PVA	71
30	Remanente del termogel de quitosán-PVA implantado en ratas.	72
31	Micrografía de la red de entrecruzamiento degradada del remanente del termogel Qn-PVA a 10000x.	72
32	Micrografía de la red de entrecruzamiento degradada del remanente del termogel Qn/ β -GF a 10000x	73
33	Mecanismo de formación del termogel de quitosán-PVA.	74
34	Mecanismo de formación del termogel de quitosán/ β -glicerofosfato.	76

➤ ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Pág.
1	Grupos sensibles a los cambios del pH.	15
2	Clasificación de los polímeros inteligentes.	17
3	Selección de charolas porta muestras usadas para DSC	32
4	Variación de peso molecular para Qn-PVA.	49
5	Variación de peso molecular para Qn/ β -GF.	49
6	Variación de concentración de Qn-PVA	50
7	Variación de concentración de Qn/ β -GF	51

➤ ÍNDICE DE GRÁFICOS.

Gráfica	Descripción	Pág.
1	Dureza de los termogeles de Qn/ β -GF y Qn/PVA.	55
2	Cohesividad de los termogeles de Qn/ β -GF y Qn/PVA.	57
3	Adhesividad de los termogeles de Qn/ β -GF y Qn/PVA.	58
4	Fuerza de fractura de los termogeles de Qn/ β -GF y Qn/PVA.	60
5	Elasticidad de los termogeles de Qn/ β -GF y Qn/PVA.	61
6	Termograma del flujo de calor total de los termogeles de Qn/ β -GF y Qn-PVA al 2% (p/v).	64
7	Termograma de la Capacidad Calorífica de los termogeles de Qn/ β -GF y Qn-PVA al 2%(p/v).	67

➤ ÍNDICE DE ANEXOS.

Núm	Descripción	Pág.
I	Análisis estadístico de dos factores del perfil de textura de los termogeles de Qn-PVA y Qn/ β -GF.	84

➤ ABREVIATURAS

Abreviatura	Descripción
NMR	Resonancia magnética nuclear
Qn/ β -GF	Quitósán/ β -glicerofosfato de sodio.
Qn-PVA	Quitósán-alcohol polivinílico.
PVA	Alcohol polivinílico
β -GF	β -glicerofosfato de sodio
DA	Grado de desacetilación.
PEC	Complejos polielectrolíticos
UCST	Temperatura superior crítica de solución
LCST	Temperatura mínima crítica de solución
IPN	Interpenetrados.
TPA	Análisis de perfil de textura.
MEB	Microscopia electrónica de barrido.
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (de sus siglas en inglés).
T _g	Temperatura de transición vítrea.
T _m	Temperatura de fusión.
ΔH	Entalpía de transición.
C _p	Capacidad calorífica.
T _c	Temperatura de cristalización.
kDa	Kilo Daltons.
NAM	N-acetilmurámico.
NAG	N-acetil-D-glucosamina.
Termogel	Hidrogel dependiente de la temperatura

OBJETIVO GENERAL.

Obtener y caracterizar un termogel de quitosán/alcohol polivinílico y quitosán/ β -glicerofosfato de sodio para formar un implante medicinal a través de inyección.

OBJETIVOS PARTICULARES.

Objetivo 1

- Obtener termogeles de quitosán-alcohol polivinílico y quitosán- β -glicerofosfato de sodio a diferentes concentraciones y a diferentes pesos moleculares de quitosán.

Objetivo 2

- Caracterizar los diferentes termogeles obtenidos por medio de análisis físicos (análisis de perfil de textura, microscopía electrónica de barrido), fisicoquímicos (calorimetría) y biológicos (degradación de los termogeles).

Objetivo 3

- Implantar a través de inyección el termogel en ratas.

INTRODUCCIÓN

En años recientes se ha despertado un gran interés por los materiales poliméricos inteligentes ya que presentan una respuesta a los cambios de estímulo como la temperatura, fuerza iónica, cambios de pH, etc., resultando en la formación de hidrogeles termosensibles, que son de gran interés en liberación de medicamentos, encapsulación de células e ingeniería de tejidos²⁶.

El desarrollo de materiales que pueden ser implantados mediante técnicas mínimamente invasivas, por medio de una inyección, permitiendo el acceso a áreas del cuerpo que de otra manera son de difícil acceso. La gelación "*in situ*" ha sido investigada para la implantación de células o la liberación de fármacos⁴⁶. Los hidrogeles que son redes poliméricas tridimensionales hidrofílicas capaces de absorber grandes cantidades de agua se han convertido en importantes sistemas⁴¹.

Se ha usado el quitosán, que es un polisacárido derivado de la quitina, que se obtiene por desacetilación alcalina de la misma, es biodegradable, biocompatible y posee actividad antimicrobiana⁴⁶, por lo que juega un importante papel en aplicaciones biomédicas^{10, 12}.

Los hidrogeles termosensibles de quitosán son utilizados para la liberación de medicamentos, los cuales están siendo preparados con diferentes técnicas, en donde se mezcla quitosán y diferentes tipos de polioles, tales como poli-*N*-isopropilacrilamida (PNIPAAm)⁴², copolímeros segmentados de poli(óxido de etileno)- poli(óxido de propileno) (PEO-PPO), copolímeros segmentados de poli(óxido de etileno)-poliésteres (PEO-PLA, PEO-PCL)²⁶, poliacrilatos, Pluronic²⁸ alcohol polivinílico⁴⁸, β -glicerofosfato de sodio⁵³.

Los hidrogeles de quitosán presentan un comportamiento único, es decir, se mantienen líquidos a temperatura de 4 °C y a un pH fisiológico, pero si son calentados a una temperatura cercana a los 37°C se convierten en geles.^{48,53}.

En el presente trabajo se realizará un estudio de termogeles de quitosán/ β -glicerofosfato de sodio y quitosán-alcohol polivinílico evaluando sus propiedades físicas, fisicoquímicas y biológicas, para formar un implante medicinal a través de inyección.



CAPITULO I

ANTECEDENTES

1.1 QUITOSÁN

1.1.1. Características del quitosán.

El quitosán, o quitosano (del griego χιτών "coraza"), es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada)³⁵, la estructura del quitosán se muestra en la Fig. 1.

El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos. Esta "quitina modificada", como él la llamó, se tornaba de color violeta en soluciones diluidas de yoduro y ácido, mientras la quitina era verde. Más tarde, en 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler quién la denominó "quitosano", pero no fue sino hasta 1950 que se identificó oficialmente como un polímero conformado de glucosamina³⁵.

El quitosán se produce comercialmente mediante la desacetilación de la quitina, que es un elemento estructural del exoesqueleto de los crustáceos (cangrejos, gambas, langostas, etc.). Su principal fuente de producción es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino, usualmente hidróxido de sodio o de potasio, a altas temperaturas. Esta sustancia tiene una gran cantidad de aplicaciones comerciales y biomédicas^{35,37}.

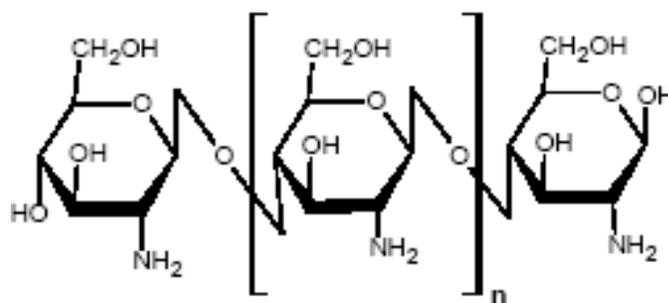


Fig.1. Estructura molecular del quitosán.

La desacetilación completa de la quitina produce un material totalmente soluble en medio ácido conocido como quitano, como se observa en la Fig. 2; sin embargo, cuando la desacetilación del material de partida es incompleta se crea una mezcla de cadenas que tienen distintas proporciones de unidades $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa y $\beta(1-4)$ -2-amino-2-desoxi- β -D-glucosa, cuya relación depende de las condiciones de reacción y que, obviamente, genera materiales con distintas propiedades denominados quitosanos. La diferencia en las propiedades de estos materiales puede llegar a ser notable, como por ejemplo la distinta solubilidad en medio acuoso que pueden llegar a tener ^{28,37}.

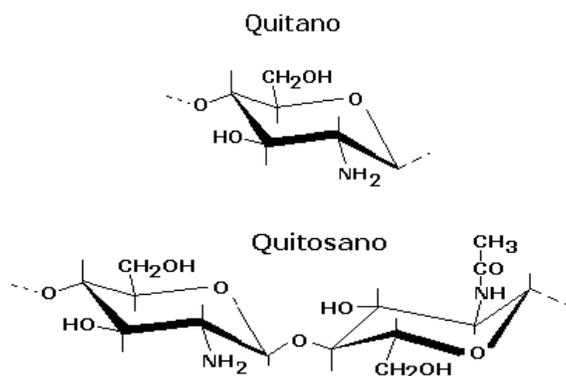


Fig. 2 Estructura del quitano y quitosán



1.1.2 Propiedades del quitosán

- Es un polielectrolito a pH ácidos, es insoluble en agua a pH's neutros, altamente solubles en soluciones de ácido nítrico e insoluble en ácido sulfúrico a cualquier concentración y temperatura. Los mejores solventes para el quitosán son soluciones de 0.2- 100% de ácido fórmico y acético³⁷.
- Su grado de desacetilación (DA) puede ser determinado por espectroscopia NMR o por titulación potenciométrica; en el quitosán se halla en el intervalo de 60-100%³⁵.
- Al poseer grupos amino libres (-NH₂) hace que el quitosán tenga propiedades policatiónicas. Por su carga positiva, interactúa con muchos compuestos que tienen cargas negativas como por ejemplo: polisacáridos aniónicos, proteínas, ácidos nucleicos dando una neutralidad eléctrica^{5,6}.
- Tiene un valor pKa que ronda los 6,5^{5,6}.
- El gran interés que tiene el quitosán proviene de sus propiedades: es bioadhesivo y puede ligarse negativamente a las superficies cargadas negativamente tales como las membranas mucosas. Debido a esta propiedad física, permite el transporte de fármacos polares a través de las superficies epiteliales¹⁰.
- Es biocompatible, biodegradable, buen adsorbente, no tóxico y presenta diversas propiedades biológicas como: actividad antimicrobiana, inmunogénica, antitumoral, anticoagulante, cicatrizante, efecto de disminución del colesterol, entre otras lo cual lo hace que presente múltiples aplicaciones médicas²³.



- Sus propiedades dependen del peso molecular y del grado de desacetilación³⁷.
- El quitosán se emplea principalmente como una ayuda en el crecimiento de las plantas, debido a sus propiedades como sustancia que permite promover la defensa de las plantas contra infecciones provocadas por hongos. Su uso ha sido aprobado por muchos cultivadores de plantas de interior y exterior ³⁷.
- Dado su bajo índice de toxicidad y su abundancia en el medio ambiente, el quitosán no es dañino ni para el ser humano ni para los animales de compañía, siempre que se emplee de acuerdo con las indicaciones establecidas.

1.1.2 Aplicaciones del quitosán

El quitosán es un biopolímero muy estudiado debido a sus potenciales aplicaciones en diferentes campos de la ciencia y la tecnología.

Ese interés proviene de sus propiedades anteriormente mencionadas, las aplicaciones del quitosán son muy diversas como se puede observar en la Fig. 3²⁸. Algunas de las principales aplicaciones son:

- Químicas:
 - ✓ Por la formación de complejos formados con quitosán y muchos iones es usado para la quelación de hierro, cobre, magnesio.
 - ✓ Por sus grupos $-NH_3^+$ el quitosán puede ser usado como floculante para remover iones de metales pesados tóxicos como la plata, plomo, mercurio y cromo³⁵.
- Agricultura.

- ✓ En el recubrimiento de semillas con películas de quitosano para su conservación durante el almacenamiento.

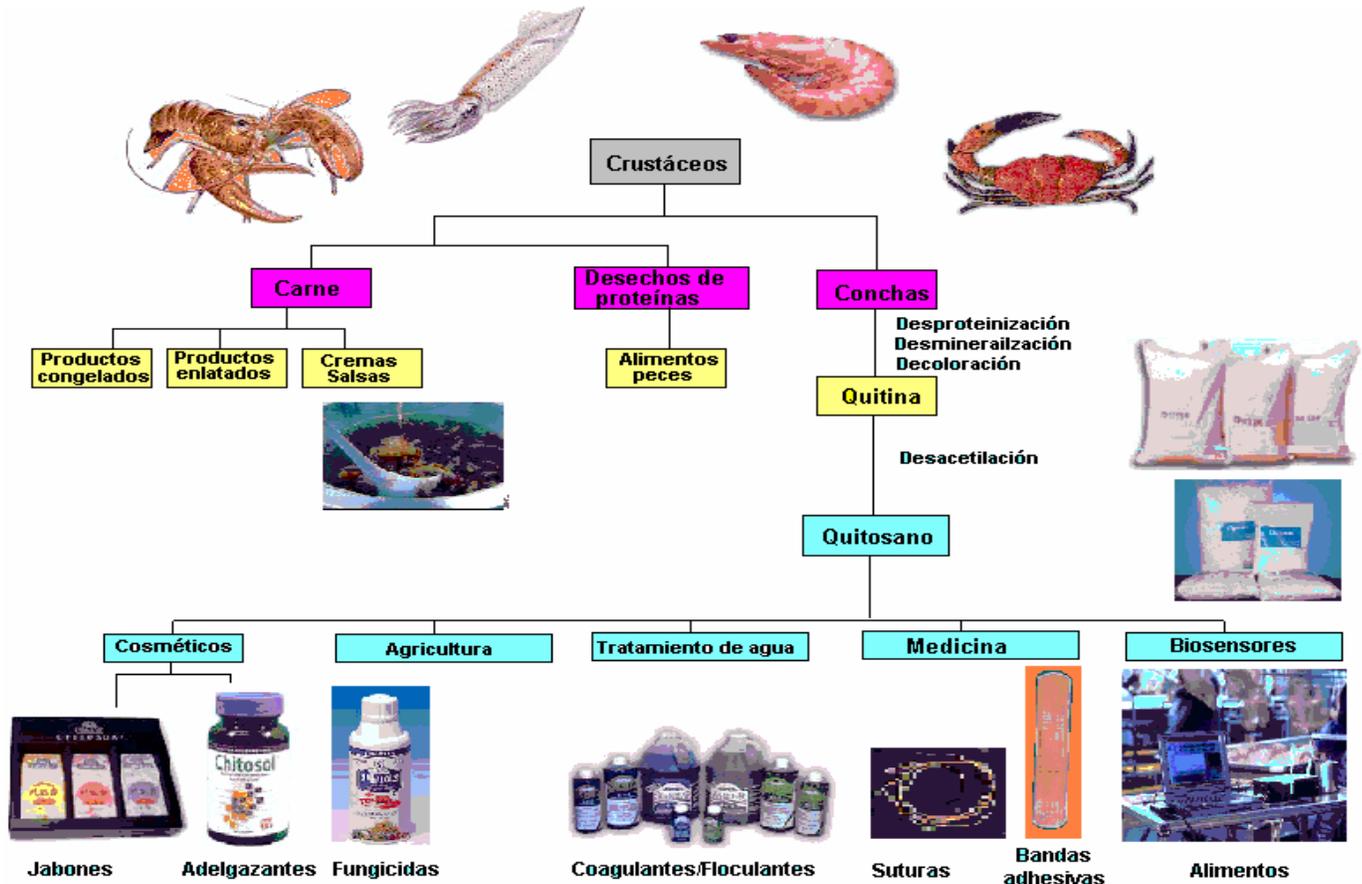


Fig.3 Esquema general para el aprovechamiento de crustáceos en el desarrollo de aplicaciones a partir de sus subproductos quitina y quitosán.

➤ Medicina.

- ✓ Para la cicatrización de las heridas.
- ✓ Al no ser tóxico y biodegradable, se usa en aplicaciones biomédicas para reducir los niveles de colesterol.
- ✓ Con la sulfatación del quitosán se puede usar como polisacáridos anticoagulantes.
- ✓ Como agente antimicrobiano y como material para la encapsulación de medicamentos.



-
- ✓ Las proteínas recuperadas de la obtención del quitosán se usan para la dieta de animales y el cloruro de calcio recuperado se usa para la obtención de hidroxiapatita (compuesto usado para la elaboración de placas dentales y ortopedia)
 - ✓ En la producción de gasas y vendajes tratados con quitosano.
 - ✓ Cremas bactericidas para el tratamiento de quemaduras³⁵.
 - Tratamiento de Aguas.
 - ✓ Por su propiedad policatiónica como coagulante primario para aguas residuales de alta turbidez y alta alcalinidad, también se usa como floculante y captura de materiales pesados y pesticidas³⁷.
 - Cosméticos.
 - ✓ Fabricación de cápsulas para adelgazar, también como aditivo bactericida en jabones, shampoos, cremas de afeitar, cremas para la piel, pasta dental y como agente hidratante para la piel³⁷.
 - Biosensores.
 - ✓ Sensor para glucosa en sangre humana, basado en la inmovilización de la enzima glucosa-oxidasa sobre quitosano²⁸.
 - Alimentos.
 - ✓ Se usa para modificar o controlar las propiedades funcionales (como espesante, texturizante, quelante, emulsificante).
 - ✓ Para inhibir el crecimiento de una amplia gama de hongos³⁷.



1.2 β-GLICEROFOSFATO DE SODIO Y EL ALCOHOL POLIVINÍLICO.

1.2.1 Características del β-glicerofosfato de sodio.

El β-glicerofosfato de sodio es un sólido cristalino de color blanco, sin olor, tiene una fórmula condensada de $C_3H_7Na_2O_{11}P$ con un peso molecular de 306.11, un punto de ebullición de 102-104°C.

El β-glicerofosfato de sodio se debe almacenar a una temperatura de 2-8°C; tiene una solubilidad en H_2O es 0.1 g/mL, teniendo una coloración transparente, tiene una mayor solubilidad en agua caliente. En solución acuosa tiene un pH arriba de 9.5. Es insoluble en alcohol⁵¹.

La estructura del β-glicerofosfato es como se muestra en la Fig. 4.

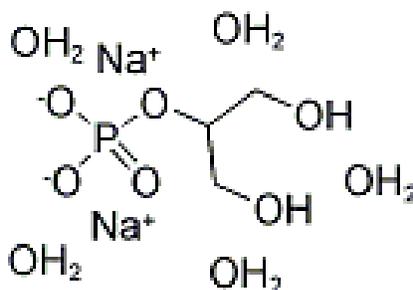


Figura 4. Estructura química del β-glicerofosfato de sodio.

Aplicaciones

El β-Glicerofosfato de sodio tiene aplicaciones en veterinaria se utiliza como una fuente de fosfato en el tratamiento de los desequilibrios del metabolismo del calcio y fosfato. Se administra, junto con otros glicerofosfatos, por inyección en el ganado. También tiene aplicaciones en la industria farmacéutica, el β-glicerofosfato es un intermediario metabólico como transportador de fosfatos⁵¹.



1.2.3 Características del alcohol polivinílico

El alcohol polivinílico (PVA) ha despertado especial interés en el campo de los materiales, ya que es ampliamente utilizado en biotecnología para encapsular enzimas y microorganismos y, actualmente, muy difundido en la industria farmacéutica como soporte de liberación lenta de fármacos³⁴.

Es un polímero sintético obtenido por hidrólisis ácida o básica del acetato de polivinilo. Es un polímero biodegradable y biocompatible. Sus propiedades dependen del peso molecular y de su grado de hidrólisis. El PVA es obtenido por hidrólisis del poliacetato de vinilo⁸. Este polímero forma fácilmente hidrogeles por métodos físicos y es muy utilizado en la preparación de biomateriales. La estructura química se presenta en la Fig. 5:

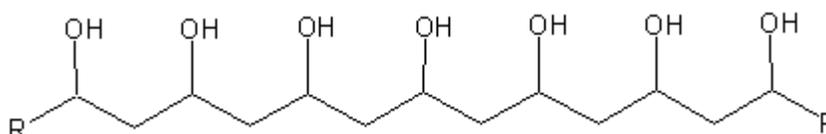


Fig.5 Estructura química del alcohol polivinílico.

El PVA es producido industrialmente por polimerización de acetato de vinilo a polivinil acetato (PVAc), seguida de una hidrólisis a PVA con liberación de los grupos acetato. Esta conversión no es completa, y se debe determinar el grado de hidrólisis alcanzado. Por esta razón, el PVA siempre se debe considerar como un copolímero de PVA y PVAc. El PVA con grado de hidrólisis del 90% es soluble en agua caliente. El grado de hidrólisis o el contenido de grupos acetato remanentes tienen fuertes implicancias en las propiedades químicas, la solubilidad y cristalización del polímero³⁴.



La estructura cristalina del PVA a nivel molecular puede ser descrita como una estructura de hebras dobles unidas entre sí por puentes hidrógeno, a los que se suman las interacciones de Van der Waals entre hebras. Una estructura plegada sobre sí misma genera pequeñas zonas ordenadas denominadas cristalinas, diseminadas entre las zonas amorfas de la matriz^{8,34}. Este polímero forma fácilmente hidrogeles por métodos físicos y es muy utilizado en la preparación de biomateriales^{5,34}.



1.3 HIDROGELES

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales e hidrofílicas, capaces de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos sin disolverse. Los hidrogeles se forman entrecruzando las cadenas poliméricas de forma iónica, covalente o mediante enlaces débiles como los puentes de hidrógeno. Esto confiere estabilidad estructural a las cadenas poliméricas^{46,38}.

La estructura química de los hidrogeles es el factor más importante que afecta a su grado de hinchamiento. Por otra parte, los hidrogeles que presentan un elevado grado de entrecruzamiento tienen una estructura más dura, por lo que disminuye la movilidad de las cadenas poliméricas y por tanto su grado de hinchamiento. Los hidrogeles que contienen grupos o moléculas hidrófilas se hinchan en mayor grado que los que contienen grupos hidrófobos³⁸.

Los entrecruzamientos tienen que estar presentes en el hidrogel para prevenir que las cadenas poliméricas hidrófilas se disuelvan en medios acuosos. Sin embargo, dado que es una ventaja para diversas aplicaciones que el hidrogel sea biodegradable, se pueden introducir en él enlaces lábiles. Estos enlaces lábiles pueden presentarse tanto en la cadena polimérica como en los puntos de entrecruzamiento. Los enlaces lábiles se pueden romper en condiciones fisiológicas hidrolizándose por acción tanto química como enzimática⁵⁷.

En aplicaciones biomédicas, además de ser biodegradables, los hidrogeles deben tener un alto grado de biocompatibilidad, y sus productos de degradación deben ser lo menos tóxicos³⁸.



Esto se traduce en que los compuestos que se formen deben poder eliminarse por las diferentes rutas metabólicas o ser excretados vía renal. En general, los hidrogeles presentan un elevado grado de biocompatibilidad, debido a que su superficie hidrófila tiene una energía libre interfacial muy baja en contacto con fluidos biológicos, por lo que las proteínas y las células no tienen tendencia a pegarse a la superficie. Además, al ser blandos y gomosos, no irritan los tejidos de alrededor⁴⁹. Los geles se pueden clasificar como geles físicos y geles químicos, dependiendo de la naturaleza de las uniones de la red tridimensional. En los geles químicos, la red se forma mediante enlaces covalentes, mientras que los geles físicos se forman por uniones conectados físicamente⁷.

Los hidrogeles que se entrecruzan químicamente son formados por enlaces covalentes irreversibles como en los hidrogeles de quitosán entrecruzados covalentemente. Los hidrogeles que se entrecruzan físicamente, son formados por varios enlaces reversibles, estos pueden ser interacciones iónicas como en los hidrogeles entrecruzados iónicamente y en los complejos polielectrolíticos (PEC) o por interacciones secundarias como los hidrogeles complejados de quitosán/alcohol polivinílico^{5,6}. Entre las características del hidrogel se encuentran el grado de hinchamiento, que puede modularse variando el grado de entrecruzamiento y la composición química⁴⁶.

1.3.1 Hidrogeles inteligentes.

Durante los últimos 30 años se ha investigado mucho en la obtención y análisis de hidrogeles sensibles al medio externo. Los materiales sensibles al ambiente sufren cambios drásticos en su grado de hinchamiento debido a cambios de pH, temperatura, fuerza iónica, naturaleza y composición del medio en el que se encuentran, reacciones químicas o enzimáticas y



estímulos eléctricos o magnéticos. En la mayoría de estos materiales existe un punto crítico en el que ocurre la transición⁵⁷.

Una característica interesante de muchos hidrogeles sensibles a estos estímulos, es que el mecanismo que causa el cambio estructural es completamente reversible³⁸.

Los hidrogeles inteligentes pueden ser clasificados basándose en su sensibilidad frente a estímulos externos, pero también pueden clasificarse en dos grupos en función de la naturaleza de sus polímeros. El primer grupo consiste en polímeros no cargados, capaces de formar enlaces de hidrógeno con moléculas de agua. Las perturbaciones de los enlaces de hidrógeno por el incremento de la temperatura, o por el cambio de la fuerza iónica en el medio, causan separaciones de fase o contracciones en el gel. Ejemplos de este grupo son: poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAM), poli(*N*-vinilpiperidina), poli(*N*-vinilcaprolactama)⁷.

El segundo grupo consiste en polímeros cargados o polielectrolitos. En medio acuoso, estos polímeros suelen ser solubles o se encuentran en su forma de gel hinchado. Cuando cambia el pH del medio o cuando se adicionan iones de bajo peso molecular o polielectrolitos de carga opuesta, la repulsión entre los segmentos poliméricos se reduce y esto conduce a la separación de fases⁷.

Hidrogeles sensibles a la temperatura.

Los hidrogeles son solubles en disolventes en un determinado intervalo de temperaturas, es decir, la estabilidad de las disoluciones de polímeros está limitada tanto a altas como a bajas temperaturas. Los materiales termosensibles pueden ser clasificados en dos categorías: (1) sensibles positivos sí poseen una temperatura superior crítica de solución (UCST) y se

contraen por enfriamiento por debajo de esta temperatura o (2) sensibles negativos cuando despliegan una temperatura mínima crítica de solución (LCST) y se contraen por calentamiento por encima de ella, como se observa en la Fig. 6. Este último fenómeno también se conoce como *Gelación Térmica Inversa*. Las soluciones acuosas de estos materiales tienen baja viscosidad a temperatura ambiente y exhiben un aumento con el calentamiento formando un gel semi-sólido o sólido cuando alcanzan la temperatura fisiológica^{41,46}.

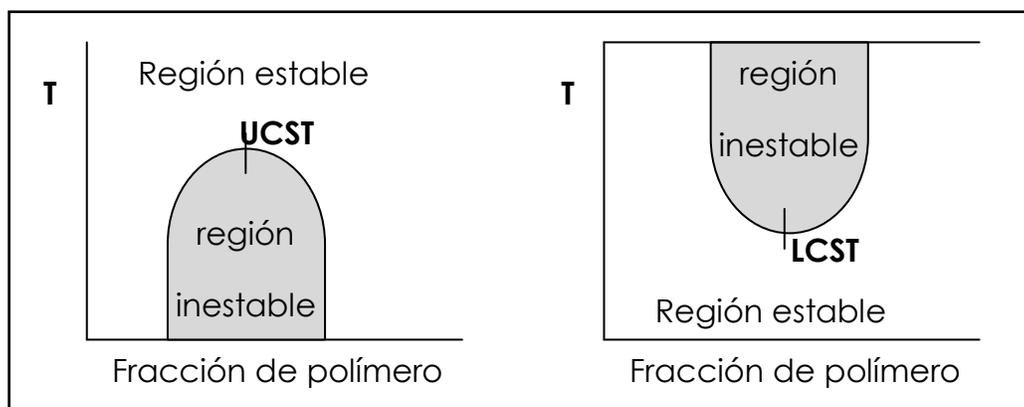


Fig. 6 Temperatura crítica superior y temperatura crítica inferior.

En el caso de hidrogeles, que son polímeros entrecruzados, por debajo de su LCST se encuentran en estado hinchado y por encima, colapsan. Ya que para la aplicación de hidrogeles termosensibles es necesaria una velocidad rápida de respuesta y cambios grandes en el volumen al variar la temperatura^{17,38}.

Hidrogeles sensibles al pH

Los polímeros sensibles al pH son polielectrólitos con grupos ácido o básico que aceptan o ceden protones en respuesta a cambios en el pH del medio.



Los ácidos y bases débiles como los ácidos carboxílicos, el ácido fosfórico y las aminas respectivamente, muestran cambios en su estado de ionización bajo variaciones de PH, como se muestran en la Tabla 1. Esto conduce a un cambio conformacional del polímero soluble y a un cambio en el hinchamiento de los hidrogeles cuando los grupos ionizables están unidos a la estructura polimérica^{7,57}.

Tabla1. Grupos sensibles a los cambios del pH.(Vara V.A. 2006)

Grupos aniónicos	Grupos catiónicos
$-\text{COO}^-$	$-\text{N}^+ -$
$-\text{OPO}_3^-$	$-\text{NH}^+$
$-\text{OSO}_3^-$	$-\text{N}_2^+$
$-\text{SO}_3^-$	$-\text{N}_3^+$
$-\text{OCS}_2^-$	$-\text{NRNH}_2^+$
$-\text{OPO}_3^{2-}$	$-\text{NR}_2\text{H}^+$
$-\text{PO}_3^{2-}$	$-\text{NR}_3^+$
$-\text{PO}_2^-$	$-\text{S}^+$
$-\text{SiO}_2^{2-}$	$-\text{P}^+$

Los polímeros sensibles al pH se emplean en diversas aplicaciones biomédicas, siendo la aplicación más importante el uso en sistemas de liberación de fármacos y sensores de glucosa⁷.

La figura 7 ilustra un comportamiento de cambio de fase de hidrogeles y polímeros sensibles al pH y a la temperatura⁷.

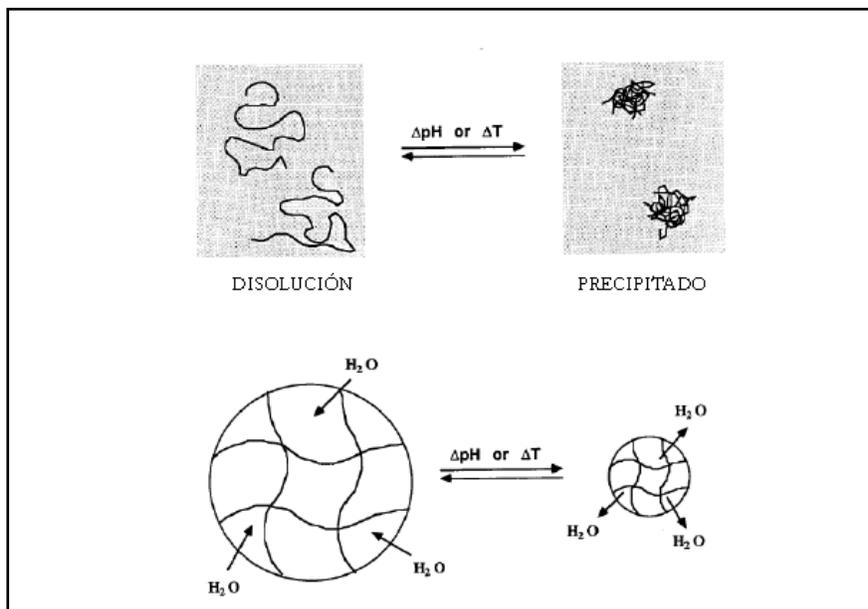


Fig. 7 Cambio de fase de hidrogeles y polímeros sensibles al pH y a la temperatura. (Cano S.E. 2008)

1.3.2 Polímeros inteligentes

El desarrollo de los primeros polímeros sintéticos hace aproximadamente un siglo introdujo el uso de materiales livianos, con ciertas propiedades mecánicas, relativamente inertes y fácilmente fabricables para diversas aplicaciones biomédicas. Sin embargo, el implante de los materiales biomédicos macroscópicos sólidos requiere de procedimientos quirúrgicos convencionales que traen aparejados daño tisular y dolor⁴⁶.

Un polímero se define como toda sustancia constituida por moléculas que se caracterizan por la repetición de uno o más tipos de unidades monoméricas⁵⁴. Según la forma de las macromoléculas, los polímeros pueden ser lineales, ramificados o entrecruzados. Los sistemas poliméricos inteligentes o polímeros sensibles al estímulo son polímeros que en respuesta a ligeros cambios en su entorno, como temperatura, pH, luz, campo eléctrico o magnético, concentración iónica, moléculas biológicas, etcétera, sufren cambios drásticos en sus propiedades^{7,38,57}.



Se ha planteado la clasificación de los polímeros inteligentes según tres puntos de referencia:

- Atendiendo al estímulo que reciben.
- Atendiendo a la respuesta que proporcionan o
- Según el tipo de material polimérico.

El interés por el comportamiento “inteligente” de los polímeros, aparece mucho mas tarde que en el caso de los materiales metálicos o cerámicos inteligentes. Durante las últimas dos décadas el papel desempeñado por los polímeros inteligentes tomó importancia rápidamente, debido a los resultados prometedores de las investigaciones que demostraban las propiedades útiles de algunos polímeros en aplicaciones prácticas. En 1991, Allan Hoffman publica un artículo en el que se describen las características, las respuestas y los mecanismos de los polímeros e hidrogeles sensibles a estímulos y menciona sus aplicaciones como biomateriales inteligentes⁷.

Los polímeros pueden clasificarse en función de su sensibilidad hacia el estímulo exterior, como se muestra en la Tabla 2. De este modo, si un polímero es sensible al campo eléctrico se denomina polímero electrosensible o electroactivo. Si un polímero es sensible a la temperatura puede denominarse termosensible, los sensibles a la luz son los llamados fotosensibles^{7,38}.

Tabla 2. Clasificación de los polímeros inteligentes. (Cano S.E. 2008)

POLÍMEROS	ESTÍMULOS	RESPUESTA
Polímeros termosensibles	Temperatura	Tensión /volumen
Polímeros fotosensibles	Intensidad de luz	Tensión/propiedad óptica
Polímeros químicamente activos	Químico	Cambio de volumen
Polímeros magnetoactivos	Campo magnético	Tensión/ luz/ color
Polímeros electrosensibles	Campo eléctrico	Tensión
Polímeros multi-sensibles (multi-respuestas)	Más de uno	Tensión/ volumen



1.3.3 Hidrogeles de quitosán entrecruzados iónicamente.

El quitosán es un polímero policatiónico que puede reaccionar con componentes cargados negativamente, ya sea un ión o una molécula aniónica, las cuales pueden conducir a la formación de una red por medio de enlaces iónicos entre las cadenas poliméricas. Las redes de entrecruzamiento iónico pueden dividirse en dos grupos dependiendo del tipo de entrecruzante a utilizarse: aniones [Mo (VI) o el Pt (II)] o moléculas aniónicas (β -glicerofosfato, tripolifosfato, citrato, sulfato, etc.). Sin embargo la mayoría de sus características y propiedades son idénticas^{6,37}.

Las interacciones entre las cargas negativas del entrecruzador y los grupos cargados positivamente del quitosán son la principal interacción dentro de la red, su naturaleza depende del tipo de entrecruzador. Los iones metálicos conducen a la formación de enlaces covalentes coordinados entre los grupos amonio del quitosán cargados positivamente, este tipo de enlace es un vínculo más fuerte que las interacciones electrostáticas formadas por moléculas aniónicas. Además de los grupos amonio del quitosán cargados positivamente, otros grupos a lo largo de la cadena de quitosán, tales como grupos hidroxilo pueden también reaccionar con el entrecruzador iónico. Por otra parte, interacciones adicionales pueden ocurrir dentro de la red, tales como interacciones hidrofóbicas o enlaces de hidrogeno intercatenarias debido a la reducción de la repulsión electrostática después de la neutralización del quitosán por el entrecruzador⁶.

Las redes formadas por entrecruzamiento iónico de quitosán son principalmente usados para liberación de drogas. El entrecruzamiento iónico permite la formación de varios sistemas como la preparación de microesferas, películas, o esponjas para la liberación controlada de fármacos. Interesantemente la adición de β -glicerofosfato permite la



preparación de un hidrogel termosensitivo que puede ser fácilmente inyectado y que favorece la regeneración de hueso⁶.

1.3.4 Hidrogeles formados por complejación polímero-polímero.

El complejo biocompatible de quitosán/PVA es similar a los complejos polielectrolíticos (PEC) con respecto a su estructura, propiedades y aplicaciones pero es formado por diferentes interacciones^{5,37}.

Los complejos polielectrolíticos se forman por la reacción de dos polielectrolitos de cargas opuestas en una solución acuosa.

La estructura de los hidrogeles de quitosán/PVA puede ser considerada como un estado intermedio entre PEC y redes formadas por injertos de quitosán-quitosán. Del mismo modo que el PEC, la red se forma por medio de un complejo de quitosán y un polímero adicional que interactúan juntos. Sin embargo, en una red de quitosán-quitosán, estas interacciones son vía secundaria (interacciones hidrofóbicas y enlaces puentes de hidrógeno) y no vía interacciones iónicas⁵.

A fin de preparar el complejo de quitosán/PVA, solo es necesario el quitosán y el PVA, es decir no se requieren moléculas auxiliares o entrecruzadores. El PVA es un polímero sintético que contiene principalmente unidades 1,3-glicol y en un porcentaje más bajo de unidades de 1,2-glicol. Como el quitosán, éste es no-tóxico, biodegradable y altamente biocompatible. Este es uno de los polímeros sintéticos más usados disponibles para aplicaciones biomédicas.

Los hidrogeles de quitosán/PVA están compuestos por componentes biocompatibles bien conocidos y sus métodos de preparación son fáciles y aseguran su biocompatibilidad. Esta es la principal ventaja de estos hidrogeles⁵.



1.3.5 Aplicaciones de los hidrogeles.

La aplicación de los hidrogeles destaca aquellas aplicaciones que podemos enmarcar en el campo de la biomedicina.

- *Prótesis en tejidos.* Las propiedades físicas de los hidrogeles permiten su empleo en prótesis de tejidos blandos. En implantes cerebrales, se han utilizado diferentes hidrogeles que actúan como sustrato para la cura y crecimiento de tejidos, así como en el encapsulamiento, trasplante y liberación de células y en la regeneración de axones. Los hidrogeles de poli (alcohol vinílico) y los interpenetrados (IPN), reforzados o no, presentan mejores propiedades mecánicas y se han estudiado como posibles sustitutos de los tendones, ligamentos y discos intervertebrales⁵⁷.
- *Prótesis de conductos humanos.* Los hidrogeles se han empleado también en prótesis de uréter, conductos biliares y esófago.
- *Revestimiento de suturas.* Los hidrogeles no poseen las propiedades mecánicas adecuadas para emplearlos en suturas quirúrgicas, sin embargo, su biocompatibilidad ha permitido su empleo como revestimiento de las suturas⁷.
- *Cirugía.* Los hidrogeles se han empleado cuando se produce un desprendimiento de retina, cirugía de córnea y corrección de glaucomas⁵⁷.
- Actualmente se trata de implementar hidrogeles que sirvan como encapsuladores y liberadores de fármacos^{5,6}.



1.4 CARACTERIZACIÓN DE TERMOGELES.

1.4.1 ANALISIS DE TEXTURA.

El estudio de las propiedades de los materiales tiene cada vez más importancia en la industria, entre las cuales están las propiedades mecánicas, las cuales se refieren a la manera en que los materiales responden a la aplicación de fuerzas, y como a consecuencia de ellas se deforman o fluyen en función del tiempo, de la medición de esta respuesta son las mediciones texturales².

La *textura* (que proviene del latín *textura-téxtere* que significa tejer) se refiere básicamente a la estructura interna de un cuerpo o material y la manifestación física macroscópica de la misma².

Debido a la importancia de la textura se ha tratado de sistematizar la evaluación ya sea desde el punto de vista sensorial como por medios instrumentales.

Muchos de los estudios y mediciones de textura que se han realizado a lo largo de la historia y han sido como los hechos por Cobb (1896) y Roberts (1910) que usaron métodos similares con granos de trigo usando como referencia la fuerza requerida para cortar un grano de trigo por la mitad, entre otros³⁹. El estudio de las propiedades mecánicas de los materiales se efectúa a través de diferentes tipos de pruebas:

- PRUEBAS FUNDAMENTALES: Son aquellas que solo dependen del material y no del instrumento y el método^{2,39}.
- PRUEBAS EMPÍRICAS: Son aquellas que se efectúan con instrumentos diseñados para un material específico, los resultados son función del instrumento^{2,39}.



➤ PRUEBAS IMITATIVAS: Son aquellas que imitan las operaciones humanas sobre los materiales para juzgar su comportamiento mecánico y el resultado representa las reacciones humanas^{2,39}.

➤ PRUEBAS SENSORIALES.

El perfil de textura fue definido por Brandt como “el análisis organolépticos del complejo de la textura de un alimento en término de sus características mecánicas, geométricas y de humedad”

Para ello se realizan los *Análisis de Perfil de Textura (TPA)* que consiste en comprimir un cubo de la muestra de 1.2 cm por lado a 25% de su altura original, dos veces, como resultado se obtiene una curva fuerza vs tiempo. De éste análisis se obtienen parámetros texturales.

- DUREZA: La dureza física es la fuerza necesaria para una deformación dada².
- COHESIVIDAD: La cohesividad física es la facultad de un material para que pueda deformarse antes de romperse².
- ELASTICIDAD: La elasticidad física es el porcentaje al cual un material deformado regresa a su condición inicial después de retirar la fuerza deformante³⁹.
- ADHESIVIDAD: Es el trabajo necesario para vencer las fuerzas de atracción entre la superficie del material y la superficie de los otros materiales que entra en contacto².
- FUERZA DE FRACTURA: Es la fuerza por la cual se rompe un material (alto grado de dureza y bajo de cohesividad)².

En todos los texturómetros se utilizan dispositivos para la ejecución de la prueba, que hacen contacto con el material para comprimirlo, cizallarlo, cortarlo y estirarlo. Pueden ser puntas, sondas o sensores, tienen formas



geométricas y placas, cilindros, conos, esferas, cuchillas, por lo que ofrecen áreas de contacto también variadas ^{2,39}.

Las fuerzas ejercidas durante una prueba pueden ser en *tensión* (si la fuerza se aplica hacia afuera del material, o sea se estira) o en *compresión* (si la fuerza se aplica hacia dentro del material), cizallamiento, torsión y extrusión. Aún cuando el tipo de prueba sea compresión o tensión debido a la forma geométrica y dimensiones de la muestra y la punta, en realidad las muestras son sometidas a diferentes tipos de esfuerzos y en muchas ocasiones ocurre cizallamiento, perforación, ruptura, etc. De tal manera que la prueba es destructiva y altera la estructura del materia ^{2,39}.

Para un análisis de textura los resultados se obtienen en forma de curvas (fuerza-distancia, fuerza-tiempo, distancia-tiempo) y por lo tanto también los parámetros derivados de las curvas (fuerza, distancias o tiempos máximos o mínimos), fuerzas-distancias y tiempos en ciertas zonas de la curva, áreas específicas para las curvas, relaciones de fuerzas, áreas, pendientes^{2,35,39}.

Para los análisis de textura, las curvas fuerza/tiempo se les conoce como **curva de perfil de textura** y a la extracción de los parámetros como **Análisis de Perfil de Textura (TPA)**. El análisis de perfil de textura puede efectuarse tanto en materiales sólidos como semisólidos y fluidos. Una curva representativa de un análisis de textura es como se muestra en la Fig. 8 2:

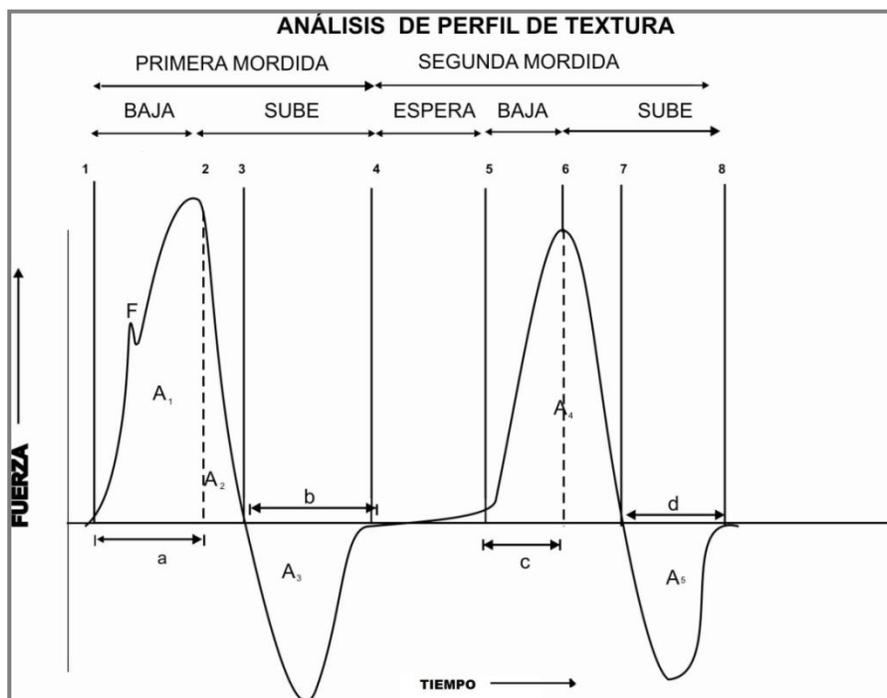


Fig.8 Curva representativa de un análisis de Perfil de Textura.

El Análisis de Perfil de Textura consiste básicamente en lo siguiente:

1. Se mide la fuerza de compresión.
2. Se indica al sensor que comprima el material a cierta distancia a una velocidad dada. La prueba se inicia cuando la punta o sensor detecta la superficie de la muestra y ésta será el punto de referencia, donde la punta viaja hacia abajo hasta llegar a la distancia adecuada.
3. La punta sube y se retira de la muestra, regresa a la posición de inicio de prueba, espera el tiempo indicado, efectúa el segundo ciclo de compresión, bajando nuevamente a la distancia indicada y regresa a la posición original antes de iniciar la prueba.
4. Durante el proceso, la punta detecta la fuerza y se obtiene la curva fuerza-tiempo. En el ciclo de compresión se mide la dureza y en la retirada de la sonda, las propiedades adhesivas.



La forma de la curva puede variar en las alturas de los picos positivos y negativos, las áreas bajos estos picos, la presencia de picos secundarios, la presencia, altura y áreas negativas^{2,39}.

Las fuerzas positivas indican la resistencia que ofrece la muestra a la penetración o compresión por parte de la punta en el proceso de bajada. Las fuerzas negativas indican la fuerza debido a la muestra que se adhiere al retirarse el sensor. De la curva se obtienen los parámetros texturales de la siguiente forma²:

1. Dureza, es la fuerza máxima en el primer ciclo de compresión.
2. Fuerza de Fractura, es el primer piso de la curva del primer ciclo de compresión
3. Cohesividad, dada por la relación entre el área positiva durante el segundo ciclo de compresión y el primero ($A_4 / A_1 + A_2$).
4. Adhesividad, dada por el área negativa del primer ciclo de compresión (A_3), representa el trabajo necesario para retirar el sensor de la muestra.
5. Elasticidad, es la altura que la muestra recupera entre el término del primer ciclo de compresión y el inicio del segundo (c).

1.4.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

En muchos campos de la química y en las ciencias de los materiales es cada vez más importante el conocimiento detallado de la naturaleza física de las superficies y el interior de los sólidos. Siendo la microscopia electrónica, la técnica que nos permite su caracterización; obteniendo la información sobre las superficies y el interior, con una resolución considerablemente elevada. Durante la década de los setenta apareció el microscopio electrónico de barrido, el cual es un instrumento diseñado para estudiar, en alta resolución, la superficie de los sólidos¹⁸.

El microscopio electrónico de barrido fue construido por el físico alemán Manfred von Ardenne en 1938 y se distribuyó comercialmente en 1965 por la compañía británica Cambridge Instruments. El microscopio de barrido electrónico puede ser extraordinariamente útil para estudiar las características morfológicas y topográficas de la superficie de los sólidos que normalmente es necesaria para entender el comportamiento de las superficies, pero proporciona poca o ninguna información acerca de su estructura interna; tiene la ventaja que necesita poca preparación de las muestras. Sin embargo tiene como limitación su escaso poder de resolución⁵².



Fig.9 Microscopio electrónico de barrido. (Lab. Microscopia Electrónica UNAM, FESC-1)

El microscopio de barrido electrónico posee características extremadamente valiosas. La primera, es que puede ser operado dentro de un margen de aumentos de 10 a 100000 X. La segunda característica, es que posee una gran profundidad de foco, por lo que la superficie topográfica de los objetos puede ser examinada con facilidad y las micrografías presentan una clara apariencia tridimensional. La tercera característica, es que su manejo es fácil, debido a que no hay lente alguno entre la muestra y la imagen final¹⁸.

Procesamiento de muestras y soporte de muestras.

La mayoría de las muestras biológicas no son conductoras por lo que se han desarrollado técnicas que permiten obtener imágenes en el microscopio electrónico de barrido, las más comunes es donde se debe utilizar un recubrimiento de la superficie de la muestra con una película metálica delgada producida por evaporación por bombardeo o por evaporación al vacío⁴⁵. En la Fig. 10 se muestra una ionizadora de oro.

Para observar una muestra por microscopía electrónica de barrido éstas deben ser anhidras, no solamente para resistir el vacío, sino también para que puedan recubrirse de oro ionizado, haciéndolas conductoras⁵².



Fig. 10 Máquina ionizadora de oro para el recubrimiento de oro de las muestras.

El portaobjetos se puede mover en dirección x, y, z y rotar alrededor de cada uno de los ejes por lo que se pueden observar las muestras casi de cualquier perspectiva.

Funcionamiento del microscopio electrónico.

El microscopio electrónico de barrido utiliza un cañón de alta energía de electrones que sistemáticamente barre mediante un rastreo programado la superficie de la muestra con un haz de electrones de energía elevada¹⁸, como se observa en la Fig. 11.

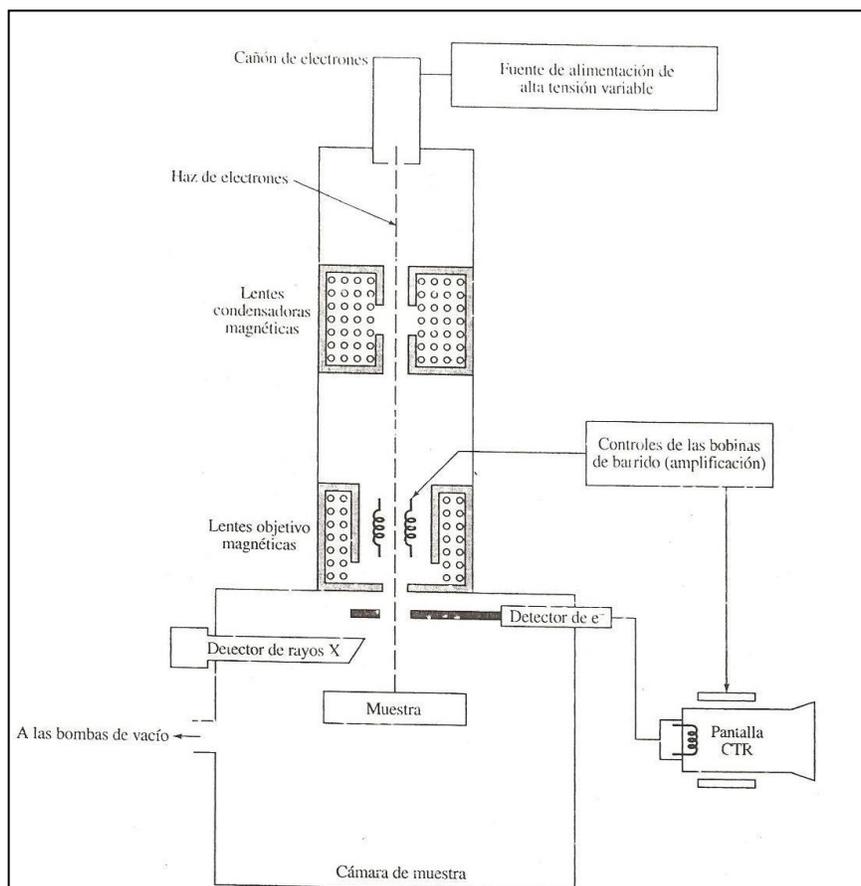


Fig.11 Esquema de un microscopio electrónico de barrido (Gallardo, Col. 2003)

Para obtener una imagen de la superficie de la muestra sólida, se barre con un haz de electrones muy fino focalizado, en el que el haz de

electrones barre la superficie en línea recta, vuelve a la posición inicial y es desplazado hacia abajo. Este proceso se repite hasta que el área deseada de la superficie ha sido barrida. Durante este proceso de barrido se recibe una señal por encima de la superficie y se almacena en un sistema computarizado donde se convierte en una imagen⁴⁵, como se observa en la Fig. 12.

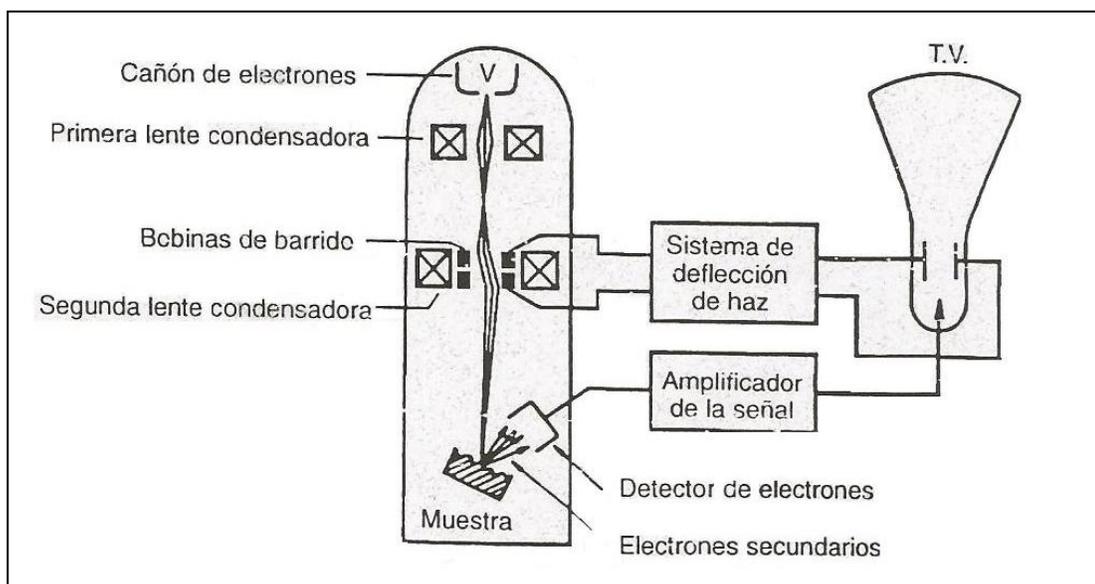


Fig.12 Formación de la imagen de la muestra. (Yacamón, Col. 1995)

Ventajas del microscopio electrónico de barrido.

1. La brillantez de la imagen no disminuye con la amplificación⁵².
2. No hay rotación de la imagen al incrementar la amplificación⁵².
3. Las fotografías se toman en forma externa al sistema de vacío del microscopio⁵².

1.4.3 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

La **Calorimetría de Barrido Diferencial** (del inglés: **Differential Scanning Calorimetry** o **DSC**) es una técnica termo analítica que se usa para monitorear los cambios en la energía térmica asociados con las transformaciones físicas y químicas de los materiales como una función de la temperatura⁴⁰, permite la determinación de calores específicos, puntos de ebullición y fusión, pureza de compuestos cristalinos, entalpías de reacción y determinación de otras transiciones de primer y segundo orden. El DSC puede trabajar en un intervalo de temperaturas que va desde la temperatura del nitrógeno líquido hasta unos 600 °C. Por esta razón esta técnica de análisis se emplea para caracterizar aquellos materiales que sufren transiciones térmicas en dicho intervalo de temperaturas, como la de los polímeros. En el campo de polímeros pueden determinarse transiciones térmicas como la temperatura de transición vítrea T_g , temperatura de fusión T_m ; se pueden hacer estudios de compatibilidad de polímeros, reacciones de polimerización¹⁹.

Funcionamiento del calorímetro diferencial de barrido.

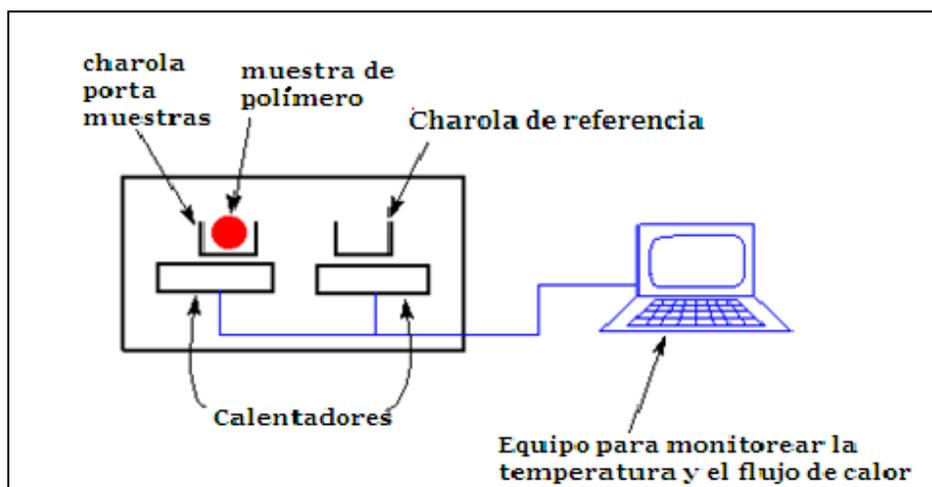


Fig.13 Esquema general de un calorímetro diferencial de barrido.



La calorimetría diferencial de barrido mide la diferencia de cantidad de calor de la muestra y de la referencia cuando la temperatura de la muestra se aumenta (o disminuye) linealmente; se mide el flujo de calor en la muestra a estudiar y en un material inerte de referencia de forma independiente¹⁹.

La Fig. 13 muestra un aparato de DSC con ambas charolas que contienen la muestra y la referencia, éstas están equipadas con un sensor para la medida de su temperatura y una resistencia de calentamiento independiente para cada una de ellas manteniéndolas aproximadamente a la misma temperatura¹⁹.

El principio básico de esta técnica es que, cuando la muestra tiene una transformación física tal como una transición de fase, se necesitará que fluya más (o menos) calor a la muestra que a la referencia para mantener ambas a la misma temperatura. El que fluya más o menos calor a la muestra depende de si el proceso es exotérmico (incremento en el flujo de calor) o endotérmico (disminución en el flujo de calor)⁴⁵.

Al determinar la diferencia de flujo calorífico entre la muestra y la referencia, los calorímetros miden la cantidad de calor absorbido o eliminado durante las transiciones.

Procesamiento de muestras.

En la Calorimetría Diferencial de Barrido se utilizan charolas porta muestras de materiales como el aluminio, carbono, oro, platino, plata y de acero inoxidable; de ahí que deba elegirse el más adecuado atendiendo al tipo

de análisis o sustancia que se vaya a analizar, como se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3. Selección de charolas porta muestras usadas para DSC.

MUESTRA DE LOS RECIPIENTES			MUESTRA
Tipo	material	forma	
abierto	Al, Au, C		Películas, polvo de bloque, fibras.
sellado	Al, Ag, Au, acero inoxidable,		Soluciones, geles, muestras que se descomponen, sublimen o liberen disolventes volátiles.

La cantidad de muestra utilizada varia, va desde los 10 hasta los 30 mg así como el estado y forma de la misma²¹. Los líquidos, geles, biomateriales y otros materiales que puedan producir compuestos volátiles durante la medición se deben de medir en charolas herméticamente cerradas. Algunos tipos de sellado y prensados son como se muestran en la Fig 14:

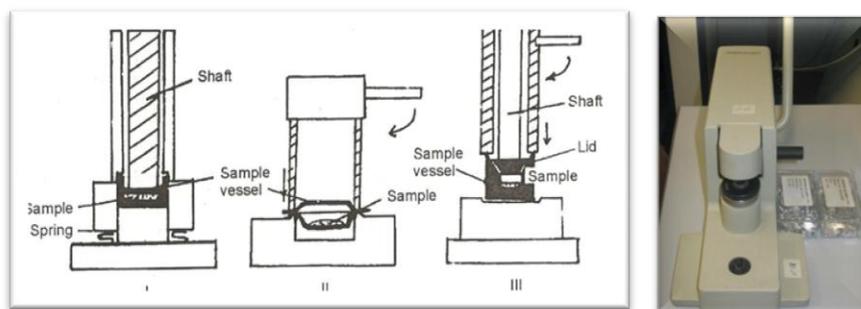


Fig. 14 (I Y II) muestras de recipientes abierto (III) muestras de charolas herméticas.

La muestra debe ser embalada en la charola reduciendo al mínimo el número de espacios vacíos entre la muestra. Como se muestra en la Fig. 15, donde el número I y IV están correctamente empacadas²¹.

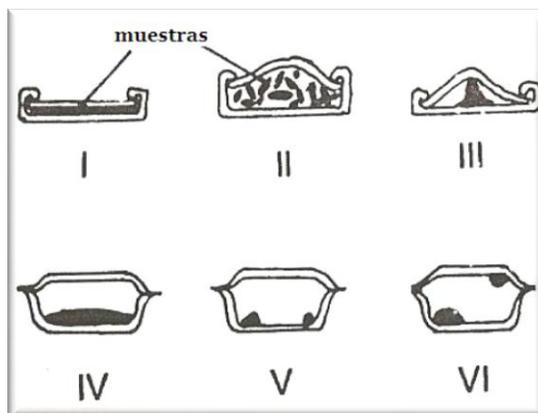


Fig15.Sistemas de envasado de tipo abierto y sellado herméticamente

Después de terminada la medición la charola que contiene la muestra se debe volver a pesar para confirmar que no haya habido pérdida de masa.

Curvas de calorimetría diferencial de barrido (DSC).

El resultado de un experimento DSC es una curva de flujo calorífico *versus* temperatura o *versus* tiempo. Existen dos convenciones diferentes al representar los efectos térmicos: las reacciones exotérmicas que exhibe la muestra pueden ser mostradas como picos positivos o negativos dependiendo del tipo de tecnología o de instrumentación utilizadas en la realización del experimento⁴⁵.

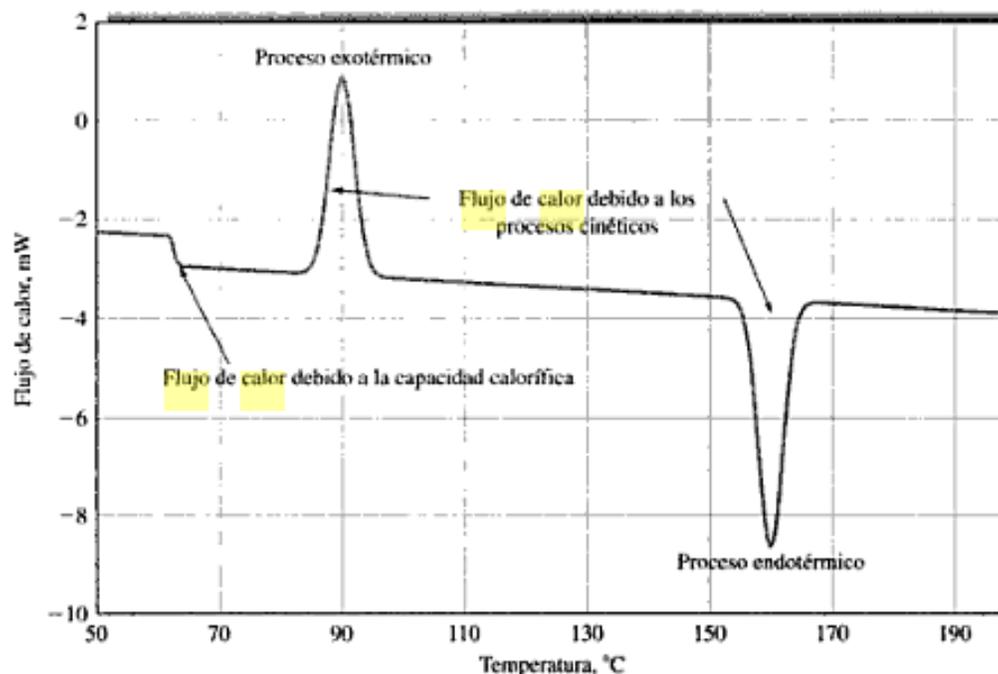


Fig16. Barrido con DSC característico para materiales poliméricos. Observe la transición por etapas a casi 63°C. Hay un fenómeno exotérmico a casi 90°C y uno endotérmico a 160°C. Note También que el termograma representa la suma del flujo de calor total debido a la capacidad calorífica y a los procesos cinéticos (Cortesía de TA instruments, New Castle, DE).

Los efectos que están sobre o bajo una curva de DSC pueden ser utilizados para calcular entalpías de transiciones térmicas. Este cálculo se realiza integrando el pico correspondiente a una transición dada⁴⁵. Así, la entalpía de la transición puede ser expresada por la siguiente ecuación:

$$\Delta H = KA \quad (1)$$

donde ΔH es la entalpía de la transición, K es la constante calorimétrica y A es el área bajo la curva. La constante calorimétrica variará de instrumento a instrumento, y puede ser determinada analizando una muestra bien caracterizada con entalpías de transición conocidas. En la DSC es posible expresar el flujo de calor total dH/dt como:

$$\frac{dH}{dt} = C_p \frac{dT}{dt} + f(T, t) \quad (2)$$

donde H es la entalpía en J mol^{-1} , C_p es la capacidad calorífica específica en JK^{-1} y $f(T, t)$ es la respuesta cinética de la muestra en J mol^{-1} . Se observa



que el flujo de calor es la suma de dos términos, uno relacionado con la capacidad calorífica y otro relacionado con la respuesta cinética⁴⁵.

El flujo de calor va a ser expresado en unidades de calor Q , suministrado por unidad de tiempo, t .

$$\frac{Q}{t} = \text{flujo de calor} \quad (3)$$

La velocidad de calentamiento es el incremento de la temperatura T , por unidad de tiempo t .

$$\frac{\Delta T}{t} = \text{velocidad de calentamiento} \quad (4)$$

Si se divide el flujo de calor Q/t por la velocidad de calentamiento T/t tendremos calor suministrado dividido por el incremento de la temperatura

$$\text{capacidad calorífica} = \frac{Q}{\Delta T} = C_p \quad (5)$$

Cuando se agrega una cierta cantidad de calor a una muestra, su temperatura se incrementará en una cierta cantidad y la cantidad de calor necesaria para producir ese determinado incremento se llama **capacidad calorífica, o C_p** ⁵⁴.

Cuando calentamos un polímero presenta transiciones térmicas como las representadas en la Fig. 17⁵⁴

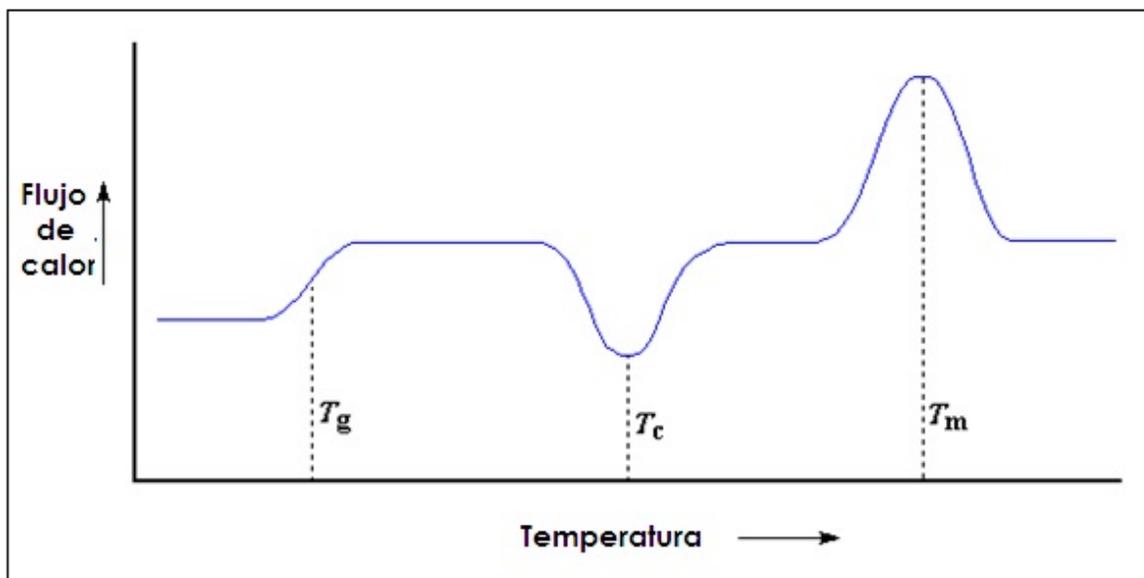


Fig. 17 Transiciones térmicas representativas de los polímeros amorfos y cristalinos en una curva de DSC.

Estos cambios representan las transiciones térmicas más importantes de los polímeros:

- Desde un valor dado de capacidad calorífica para el polímero a bajas temperaturas, la primera transición que se registrará será un corto intervalo de temperaturas en que la capacidad calorífica aumenta constantemente hasta un nuevo valor. Está ocurriendo la transición vítrea, la cual se define como una transición térmica de los polímeros, exclusiva de sus regiones amorfas, en las que pasan de su estado vítreo a su estado gomoso. El polímero amorfo pasa de comportarse como un material rígido a hacerlo como un material fácilmente deformable. A nivel molecular, la transición vítrea define la temperatura (o intervalo de temperaturas) a partir de la cual los segmentos que constituyen la cadena comienzan a tener una gran libertad de rotación interna⁵⁴. El punto medio del intervalo es lo que se denomina T_g del polímero el cual se representa en el primer punto de la Fig. 17.



- A mayores temperaturas, puede observarse en aquellos polímeros capaces de cristalizar, aunque sea parcialmente, un descenso en el calor diferencial entregado que ocurre. Es la T_c , temperatura de cristalización, el descenso de la cantidad de calor entregada por grado representa el descenso de energía por la cristalización⁵⁴.
- Finalmente, a mayores temperaturas un pico en el flujo de calor indica la temperatura de fusión de las zonas cristalinas⁵⁴.

En la Fig. 17 la curva de DSC se aprecia una gran diferencia entre la transición vítrea y las otras dos transiciones térmicas, cristalización y fusión. En el caso de la transición vítrea, no hay ninguna depresión, como así tampoco ningún pico. Esto es porque durante la transición vítrea, no hay calor latente entregado o absorbido. Pero la fusión y la cristalización sí involucran entrega o absorción de calor. Lo único que vemos en la temperatura de transición vítrea es un cambio en la capacidad calorífica del polímero.

La depresión que forma la cristalización y el pico de fusión sólo aparecerá en los polímeros capaces de formar cristales. Los polímeros completamente amorfos, no exhibirán ni cristalización ni fusión, pero los polímeros que contengan dominios tanto cristalinos como amorfos, mostrarán todas las características que se observan en la Fig. 17.

Aplicaciones de la calorimetría diferencial de barrido.

La calorimetría diferencial de barrido puede ser utilizada para medir varias propiedades características de una muestra. Usando esta técnica es posible caracterizar procesos como la fusión y la cristalización así como temperaturas de transiciones vítreas (T_g).



La técnica de DSC es utilizada ampliamente en la Industria como:

- instrumento de control de calidad debido a su aplicabilidad en valorar la pureza de las muestras¹⁹.
- para estudiar la oxidación la estabilidad a la oxidación de muestras,
- reacciones químicas²¹.
- La DSC es de utilización frecuente en las industrias farmacéuticas y de polímeros que permite el ajuste fino de propiedades poliméricas¹⁹.

1.5 DEGRADACION DE BIOPOLIMEROS.

Los organismos vivos no sólo pueden sintetizar biopolímeros como las proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos (incluyendo la celulosa), sino que también son capaces de degradarlos.

Comúnmente, la descomposición de productos naturales permite que sean utilizados por otros organismos para la producción de energía o la síntesis de nuevos compuestos (incluidos los biopolímeros).

Los organismos vivos son capaces de producir enzimas que pueden atacar a los biopolímeros, por lo que el ataque es generalmente específico con respecto a la pareja enzima / biopolímeros y al lugar del ataque en el polímero. De este modo, se garantiza la formación de productos de descomposición específica. La degradación de los materiales biopoliméricos viene determinada por su composición monomérica y la estructura espacial del polímero final⁴³.

Los polímeros biodegradables que vayan a ser utilizados como implantes para aplicaciones biomédicas deben ajustarse a las siguientes propiedades³⁸:



- El implante debe presentar un comportamiento mecánico adecuado durante suficiente tiempo (4-6 semanas como mínimo) para garantizar un buen proceso de regeneración en la zona de aplicación.
- Para ello, los materiales seleccionados deben de degradarse mediante mecanismos que estén bien controlados en el tiempo, por ejemplo que no sufran fragmentaciones prematuras, o erosiones aceleradas por procesos autocatalíticos en el medio fisiológico.
- Se exige una buena compatibilidad del implante, lo que no solo depende de la naturaleza química del mismo, sino además de variables a controlar como son la forma, el tamaño, o incluso el punto de aplicación.
- Puesto que los sistemas biodegradables se reabsorben mediante mecanismos causados generalmente por reacciones hidrolíticas, activadas por enzimas catalíticos (esterasas, amidasas, lipasas, etc.), los productos que se producen como consecuencia de las reacciones no deben presentar toxicidad tanto a nivel local como en los órganos encargados de su eliminación (hígado, riñón).

La biodegradación se lleva a cabo en tres etapas definidas⁵⁵:

- ***Etapas de Hidrólisis:*** Las moléculas de H₂O remanentes en los huecos de la estructura, realizan un ataque nucleofílico sobre los enlaces de las largas cadenas poliméricas, resultando pequeños fragmentos hidrosolubles.
- ***Etapas de Metabolización:*** Estos pequeños fragmentos hidrosolubles entran en el ciclo del ácido cítrico o Ciclo de Krebs donde son metabolizados a ácidos monoméricos.



- **Etapa de Excreción:** Las moléculas de H₂O y CO₂ resultantes del Ciclo de Krebs son expulsadas del cuerpo a través de la orina en su mayor proporción, y en menor a través del aliento.

Los mecanismos generales de degradación de los polímeros son por vía química o biológica. Los organismos vivos producen enzimas capaces de atacar a los biopolímeros. Estas enzimas son proteínas de complicada estructura química y diferentes pesos moleculares que van de 10³ a 10⁶ KDa. Poseen grupos hidrofílicos (COOH, OH, NH₂) y son comúnmente solubles en sistemas acuosos. Su precipitación es usualmente causada por alta concentración de sales univalentes y bajas concentraciones de iones metálicos multivalentes⁴³.

La lisozima, también llamada muramidasa, es una enzima de 14,4 kilo Dalton que daña las células bacterianas catalizando la hidrólisis de las uniones beta 1,4 entre los residuos del ácido N-acetilmurámico (NAM) y el carbono cuatro de la N-acetil-D-glucosamina (NAG) en un peptidoglicano, en un polisacárido alternante de NAM-NAG⁵⁶.

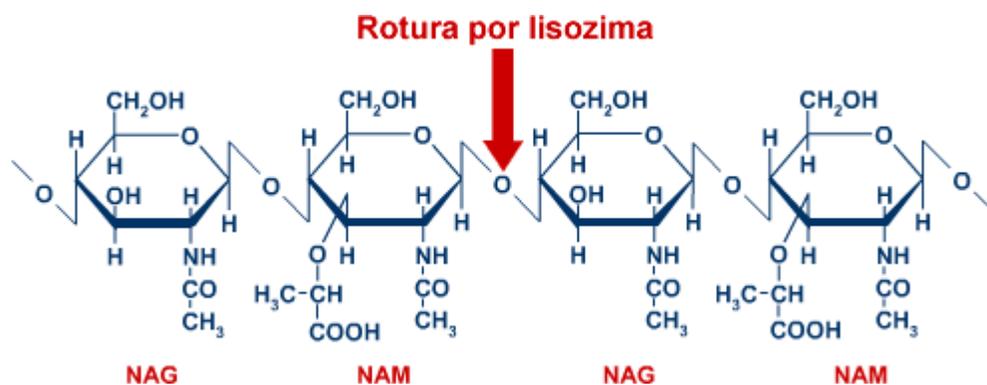


Fig.18 Estructura química del sitio de lisis de la lisozima.

Así pues estas enzimas disuelven la pared celular, dando lugar a la lisis y la muerte bacteriana. La lisozima se une a un hexasacárido deformando el



cuarto azúcar (el anillo D) que adopta una conformación de media silla. En este estado de tensión el enlace glucosídico es fácilmente roto⁵⁶.

Es importante evaluar el proceso de degradación de los polímeros de muestras sometidas a diferentes tiempos de inmersión en medios acuosos en condiciones fisiológicas.

2.1 CUADRO METODOLÓGICO

OBJETIVO GENERAL. Obtener un termogel de quitosán/alcohol polivinílico y quitosán/ β -glicerofosfato y caracterizarlo en base a sus propiedades físicas, fisicoquímicas y biológicas basado en de sodio para formar un implante medicinal a través de inyección.

Objetivo 1 Evaluación de termogeles de quitosán-alcohol polivinílico y quitosán- β -glicerofosfato de sodio a diferentes concentraciones y diferentes pesos moleculares de quitosán.

Actividad 1

Preparación de la solución de quitosán

Preparación de la solución de alcohol polivinílico (PVA).

Añadir la solución de PVA a la solución de quitosán.

Agitar por 15 min y posteriormente incubar a 37°C.

Se realiza el mismo procedimiento para el β -glicerofosfato.

Actividad 2

Evaluar la influencia del peso molecular en el pH de los termogeles variando tres pesos moleculares a una concentración del 2% (p/v) de quitosán.

Evaluar la influencia de la concentración en el pH de los termogeles variando concentraciones al 1%, 2%, 3% y 5% p/v de quitosán para determinar la concentración a la cual pueda inyectarse.

Objetivo 2. Caracterizar los diferentes termogeles obtenidos por medio de pruebas físicas (textura, microscopia electrónica de barrido), fisicoquímicas (calorimetría) y biológicas (degradación de los termogeles).

Actividad 1 Observación de la estructura de los termogeles liofilizada por microscopia electrónica utilizando un microscopio electrónico JSM-25S II JEOL.

Actividad 2 Evaluación de los parámetros texturales de los termogeles de Qn/ β -GF y Qn-PVA a cuatro diferentes concentraciones de quitosán (1%, 2%, 3% y 5%).

Actividad 3 Evaluación de los termogeles de Qn/ β -GF y Qn-PVA por calorimetría diferencial de barrido.

Actividad 4 Degradación *in vitro* del termogel de Quitosán- β -GF y Quitosán-PVA durante 3 semanas, en buffer de fosfatos y lizosima haciendo un registro fotográfico.

Resultados y Discusión

Conclusión

Objetivo 3. Implantar a través de inyección el termogel en ratas.

Preparación de un termogel de quitosán-PVA y quitosán- β -glicerofosfato como se indica en el objetivo 1.

Se usaran ratas de 9 meses de edad

Se inyectan ratas subcutáneamente 300 ul de la mezcla de quitosán-PVA y quitosán- β -glicerofosfato en el área peritoneal.

Se extrae el implante termogel de quitosán/PVA de las ratas después de 5 días.

Congelación y liofilización del implante extraído de la rata.

Análisis por microscopia electrónica los implantes liofilizados, en un microscopio JSM-25S II JEOL.



CAPITULO II

2.1 METODOLOGÍA

El quitosán utilizado se obtuvo del laboratorio de Biotecnología unidad posgrado FES-Cuautitlán Campo 1. Caracterizado mediante el uso de la patente: Solicitud de Patente "Proceso para la extracción de quitina a partir de crustáceos y su conversión a quitosán. En trámite Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial No. de expediente 005444. Mayo 31 2000. No de folio 1175930-5.

ETAPA 1

Objetivo 1 Obtener termogeles de quitosán-alcohol polivinílico y quitosán- β -glicerofosfato de sodio a diferentes concentraciones y a diferentes pesos moleculares de quitosán.

Actividad 1. Variación del peso molecular del quitosán en la formación de los termogeles.

➤ **Formación de termogeles Quitosán/PVA.**

Se prepararon soluciones de quitosán en solución buffer de ácido acético 0.2 M/acetato de sodio 0.2 M a pH 4.6 a una concentración al 2% (p/v) con diferentes pesos moleculares de quitosán.

	PESO MOLECULAR Da	% DA
1	55,435.135	95
2	118,541.085	95
3	192,132.263	97



Se prepararon soluciones de alcohol polivinílico al 2% alcalinizada. Se enfriaron ambas muestras en un baño de hielo. Posteriormente, se añadió la solución de alcohol polivinílico a la solución de quitosán y se agitó por 15 min. Se colocaron las soluciones de la mezcla de los geles ya enfriada en una incubadora a 37°C durante 24 horas.

Por medio de un análisis cualitativo (consistencia del gel al tacto, color, pH_{final} de la mezcla), se evaluó si existe influencia del peso molecular en la formación de los termogeles de quitosán, así como la influencia del pH final de la mezcla para dicha formación.

	PM (Da) QUITOSÁN	pH_{FINAL} Q-PVA	CARACTERISTICAS Y COLOR DEL GEL
1	55,435.135		
2	118,541.085		
3	192,132.263		

Formación de termogeles Quitosán/ β -GF.

Se prepararon soluciones de quitosán en solución buffer de ácido acético 0.2 M/acetato de sodio 0.2 M a pH 4.6 a una concentración al 2% (p/v) a diferentes pesos moleculares de quitosán.

	PESO MOLECULAR Da	% DA
1	55,435.135	95
2	118,541.085	95
3	192,132.263	97

Se prepararan soluciones de β -glicerofosfato de sodio al 2% (p/v). Se enfriaron ambas soluciones en un baño de hielo. Posteriormente, se añadió la solución de β -GF a la solución de quitosán y se agitó por 15 min. Se colocó la mezcla del polímero más el contra ión ya enfriado en una incubadora a 37°C durante 24 horas.



Por medio de un análisis cualitativo (consistencia del gel al tacto, color, pH_{final} de la mezcla), se evaluó si existe influencia del peso molecular en la formación de los termogeles de quitosán, así como la influencia del pH final de la mezcla para dicha formación.

	PM (Da) QUITOSÁN	pH_{FINAL} Q/βGF	CARACTERÍSTICAS Y COLOR DEL GEL
1	55,435.135		
2	118,541.085		
3	192,132.263		

Actividad 2. Variación de concentración de quitosán.

Se prepararon soluciones de quitosán en solución buffer de ácido acético 0.2 M/acetato de sodio 0.2 M a pH 4.6 a una concentración al 2%, a diferentes concentraciones de quitosán. Las concentraciones utilizadas fueron al 1%, 2%, 3% y 5% (p/v) de quitosán.

Se prepararon soluciones de alcohol polivinílico para formar los termogeles como en la actividad 1. Se realizó el mismo procedimiento para los termogeles de quitosán- β -glicerofosfato de sodio.

Se determinó la concentración de quitosán adecuada para la formación de los termogeles (líquido a temperatura ambiente y sólido a 37°C) de manera cualitativa (consistencia del gel al tacto, color, pH_{final} de la mezcla). Así como la influencia del pH final de la mezcla.

CONCENTRACIÓN DE QUITOSAN	PM (Da) QUITOSÁN	pH_{final} Q-PVA	CARACTERÍSTICAS Y COLOR	INYECTABLE
1 %				
2%				
3%				
5%				



CONCENTRACIÓN DE QUITOSAN	PM (Da) QUITOSÁN	pH _{final} Q-PVA	CARACTERÍSTICAS Y COLOR	INYECTABLE
1 %				
2%				
3%				
5%				

ETAPA 2. CARACTERIZACIÓN DE LOS TERMOGELES DE QUITOSÁN.

Objetivo 2. Caracterizar los diferentes termogeles obtenidos por medio de pruebas físicas (microscopía electrónica de barrido **MDB**, análisis de perfil de textura **APT**), biológicas (degradación de los termogeles) y fisicoquímicas (calorimetría diferencial de barrido **DSC**).

Actividad 1. Microscopía electrónica de barrido.

Los termogeles de quitosán-PVA y termogeles de quitosán- β -glicerofosfato al 2% (p/v) fueron congeladas a -20°C durante 24 horas. Una vez congelados los termogeles fueron secados mediante una cámara de liofilización Labconco Mod. Freezone 6 a -34°C durante 72 horas a una $P=-40\text{mBar}$, con una bomba de vacío de 2 etapas, los geles liofilizados fueron cortados y colocados sobre una base de plata y fueron recubiertas de oro en una ionizadora de oro (o vaporizadora de oro) *ion sputter* para conferirle propiedades conductivas. La morfología de los geles secos fue observada mediante un microscopio electrónico de barrido JSM-255 II Scanning Microscope JEOL FES- Cuautitlán, a diferentes aumentos (45x, 300x, 1000x y 1500x), con un voltaje de 12.5 KV.



Actividad 2. Análisis de perfil de textura.

Se utilizaron termogeles de quitosán-PVA y quitosán- β -glicerofosfato de sodio al 1%, 2%, 3% y 5%(p/v).

Una vez formados los termogeles estos fueron analizados en un texturómetro Lloyd TA 500 fijando el protocolo de experimentación con las siguientes condiciones:

1. Se usó un sensor en forma de cilindro de $\frac{1}{2}$ pulgada.
2. El recipiente para las mezclas fue de 1 cm de altura.
3. Los termogeles de quitosán fueron analizados a 37 °C.
4. La celda de carga fue de 1Kg.
5. Se realizaron 4 repeticiones para cada concentración.

Se analizaron parámetros como dureza, elasticidad, fuerza de fractura, adhesividad, cohesividad, utilizando un análisis de varianza de dos factores.

Actividad 3. Calorimetría diferencial de barrido.

Las medidas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se llevaron a cabo utilizando un calorímetro diferencial de barrido 2920 Modulated DSC y un sistema mecánico de enfriamiento RCS; el protocolo de prueba fue: La velocidad de barrido de 10°C/min, con una modulación de $\pm 0.796^\circ\text{C}$, bajo una atmósfera de nitrógeno a 60 ml/min, con un intervalo de temperatura de -10°C a 150°C. Las soluciones de quitosán-PVA y quitosán/ β -glicerofosfato (2% p/v) se colocaron en charolas de aluminio y se sellaron herméticamente. Se realizaron 2 repeticiones por cada uno de los termogeles, se obtuvieron parámetros como la temperatura de transición vítrea (T_g), entalpía, capacidad calorífica. Se analizó el



comportamiento estructural de los termogeles, así como los parámetros anteriormente mencionados.

Actividad 4. Degradación de los termogeles de quitosán.

Se prepararon geles de quitosán/PVA y quitosán/ β -glicerofosfato de sodio al 2% p/v. Los cuales fueron colocados en una solución buffer de fosfato de sodio monobásico 0.2 M/fosfato de sodio dibásico 0.2 M a pH= 7.4 conteniendo 4mg/ml de lisozima (F. Ganji et al., 2007). Se registró la degradación de los termogeles a través de fotografías durante 3 semanas.

ETAPA 3 IMPLANTE DE LOS TERMOGELES DE QUITOSÁN EN RATAS.

Objetivo 3. Implantar a través de inyección el termogel en ratas.

Actividad 1. Se prepararon geles de quitosán-PVA y quitosán/ β -glicerofosfato de sodio al 2% p/v,

Actividad 2. Las mezclas de los termogeles líquidos, se inyectaron a cada una de las ratas subcutáneamente. Después de 5 días se extrajeron los implantes remanentes de los termogeles de las ratas.

Actividad 3. Los implantes extraídos se congelaron a -20°C durante 24 horas y fueron secados mediante liofilización durante 48 horas. Estos geles liofilizados fueron cortados y colocados sobre una base de plata y fueron recubiertos de oro en una ionizadora de oro *ion sputter* para conferirle propiedades conductivas. La morfología de los geles secos fue observada mediante un microscopio electrónico de barrido JSM-255 II Scanning Microscope JEOL FES- Cuautitlán, a un aumento de 10000x



CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Termogeles obtenidos a diferentes pesos moleculares y concentraciones de quitosán.

Actividad 1. Variación del peso molecular del quitosán en la formación de los termogeles de quitosán-alcohol polivinílico (PVA) y quitosán/ β -glicerofosfato (Qn/ β -GF).

En la preparación de los termogeles de Qn-PVA y Qn/ β -GF donde se utilizaron 3 diferentes pesos moleculares de quitosán, se observó que con los tres pesos moleculares se formaron sólidos con diferentes características físicas como se detalla en la Tabla 4 y 5:

Tabla 4. Variación de peso molecular para Qn-PVA.

	PM(Da)	pH FINAL Qn- PVA	CARACTERÍSTICAS CONSISTENCIA Y COLOR
1	55,435.135	7.0	Gel blando
2	118,541.085	7.316	Gel transparente y duro
3	192,132.263	6.9	Gel muy blando, con liberación de agua

Tabla5. Variación de peso molecular para Qn/ β -GF

	PM (Da)	pH FINAL Qn/β-GF	CARACTERÍSTICAS CONSISTENCIA Y COLOR
1	55,435.135	7.01	Gel blando
2	118,541.085	7.300	Gel blanco y duro
3	192,132.263	6.8	Gel blando

En los resultados obtenidos se observó que tanto los termogeles de Qn-PVA como de Qn/ β -GF se formaron unas masas sólidas, sin embargo, presentaron marcadas diferencias de consistencia. Se observó que el peso molecular no influye en la formación de los termogeles; estos resultados



concuerdan con los obtenidos por (Chenite *et al.*, 2000) en los que realizó estudios con diferentes pesos moleculares de quitosán para la formación de termogeles y concluyó que el peso molecular no muestra un efecto significativo en la temperatura de gelación.

Sin embargo, en ambos casos, la formación de los termogeles depende del pH final de la mezcla, ya que por debajo de pH= 7.0 los geles son blandos o incluso no se llegaron a formar, y por encima de pH=7.0 las características de los termogeles tienen una consistencia más regular y compacta.

De acuerdo a los resultados obtenidos los termogeles de quitosán con un peso molecular de 118,541Da y el pH por encima de 7.0 es el que mejor consistencia presentó tanto para los geles de Qn/ β -GF como para Qn-PVA.

➤ **Actividad 2. Variación de la concentración de quitosán.**

Debido a los resultados obtenidos en la actividad anterior se hizo una variación de concentración de quitosán utilizando el peso molecular de 118,541 Da. La determinación de la concentración para la formación del termogel con mejores características de consistencia se muestra en la Tabla 6 y 7.

Tabla 6. Variación de concentración de Qn-PVA

CONCENTRACIÓN DE QUITOSAN	PM (DA)	PH _{FINAL} Q- PVA	CARACTERISTICAS CONSISTENCIA Y COLOR	INYECTABLE
1 %	118,541.085	7.182	Gel blando con liberación de agua	si
2%	118,541.085	7.3	Gel	si
3%	118,541.085	7.0	Gel	si
5%	118,541.085	7.0	Gel muy duro	no



Tabla 7. Variación de concentración de Qn/ β -GF

CONCENTRACIÓN DE QITOSAN	PM (DA)	pH_{FINAL} Q-β-GF	CARACTERÍSTICAS Y COLOR	INYECTABLE
1 %	118,541.085	7.200	Gel blando	si
2%	118,541.085	7.300	Gel	si
3%	118,541.085	7.310	Gel	si
5%	118,541.085	7.353	Gel duro	no

En la variación de la concentración de los termogeles de Qn/ β -GF y Qn-PVA se observó que el pH de la mezcla, influyó en la consistencia del gel formado. También la concentración del quitosán influyó, ya que a mayor concentración de quitosán, los termogeles presentaron mayor consistencia como puede observarse en las Tablas 6 y 7.

El termogel de Qn/ β -GF al 1% fue muy blando. El termogel de Qn/ β -GF al 2% fue más compacto; ya que al momento de la preparación tuvo una consistencia líquida adecuada para ser inyectado y al ser llevado a una temperatura de 37°C se obtuvo un gel firme y consistente.

El termogel de Qn-PVA al 2% obtenido presentó una consistencia líquida adecuada para ser inyectado y ya como gel formado a 37°C presentó una consistencia fuerte con liberación de agua.

Las concentraciones del 3% y 5% de los termogeles de Qn/ β -GF y Qn-PVA fueron descartadas debido a que presentaron una consistencia muy espesa imposible de inyectarse.

Debido a los resultados anteriores el quitosán de peso molecular 118,541 Da, la concentración de las mezclas al 2% (p/v) y pH final de las mezclas por encima de 7.0, son las adecuadas para la formación de los termogeles de Qn/ β -GF y Qn-PVA.



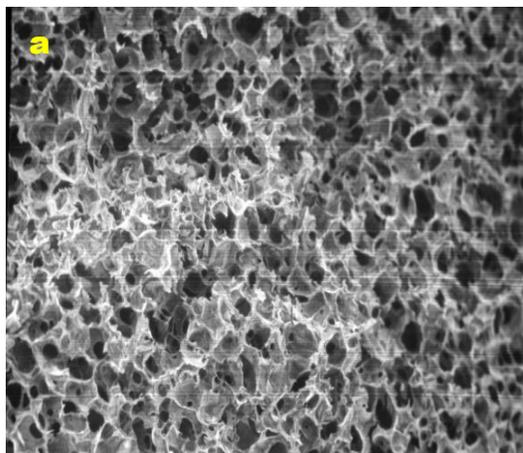
3.2. ETAPA 2. CARACTERIZACIÓN DE LOS TERMOGELES DE QUITOSAN/ β -GLICEROFOSFATO Y QUITOSAN-ALCOHOL POLIVINÍLICO.

3.2.1 Actividad 1. Microscopia electrónica de barrido.

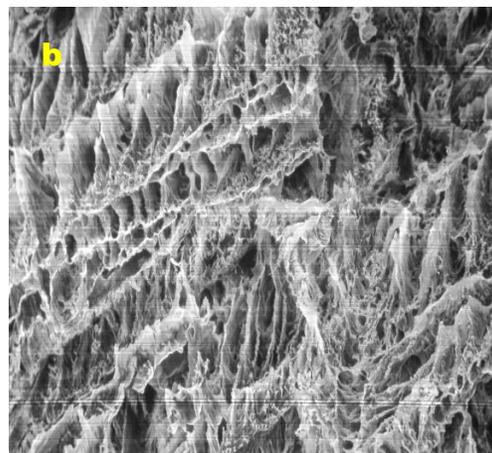
Las micrografías MEB se utilizaron para analizar la morfología de los termogeles de quitosán / β -glicerofosfato, quitosán-alcohol polivinílico al 2% (p/v), se usó esta concentración debido a que fue la que presentó los mejores resultados en las pruebas de la Etapa 1. Se va a calcular la distribución de tamaño de poros. Las mismas fueron tomadas con un microscopio JSM-255 II Scanning Microscope JEOL, sobre la superficie del hidrogel.

En la Fig.19 se muestran las micrografías por MEB a diferentes aumentos 45x, 300x y 1000x donde se pueden observar las diferencias del tamaño de poro de los hidrogeles obtenidos.

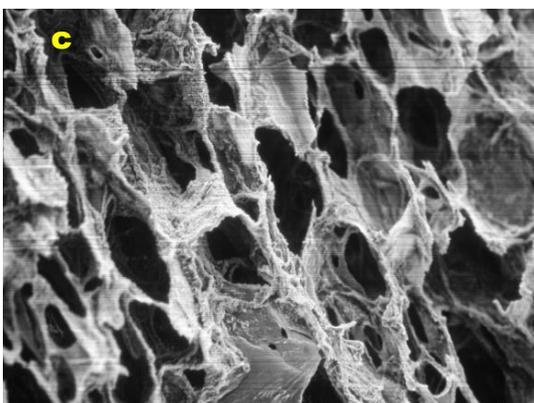
En estas fotografías se observa que al incubar los termogeles a 37° C se forma una matriz de entrecruzamiento con poros de un tamaño promedio de 30 micras para el Qn-PVA y de 42.5 micras para el Qn/ β -GF.



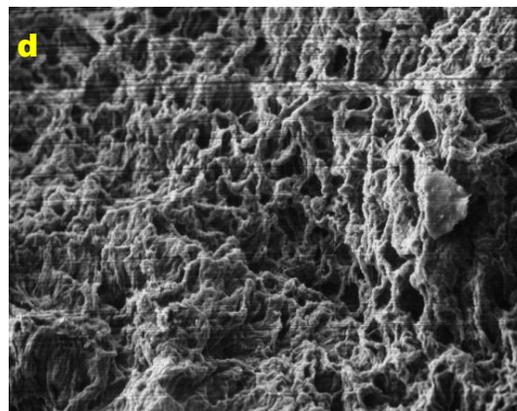
(a) Qitosán/ β -GF 45x



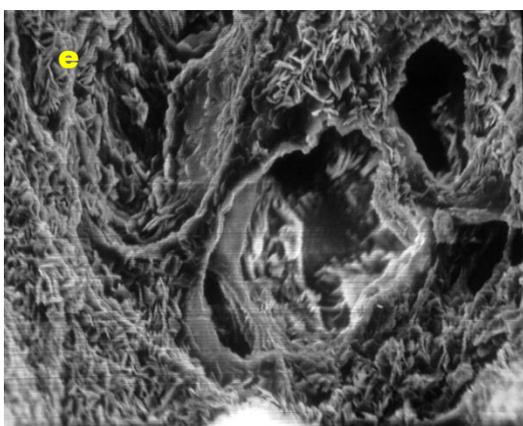
(b) Qitosán-PVA 45x



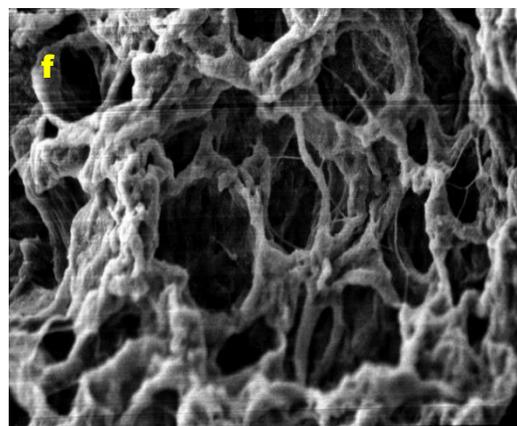
(c) Qitosán/ β -GF 300x



(d) Qitosán-PVA 300x



(e) Qitosán/ β -GF 1000x



(f) Qitosán-PVA 1000x

Fig.19 Micrografías de barrido electrónico de los termogeles de Qn/ β -GF y Qn-PVA.al 2%(p/v) (a y b) a 45 (c y d); a 300x (e y f) a 1000x.



Las micrografías a y b tomadas en la superficie de los dos termogeles a 45x, se observó que en el termogel de Quitosán/ β -GF presenta poros más regulares en comparación con el termogel de quitosán-PVA que presenta poros más alargados.

En las micrografías c y d tomadas de canto a 300x, se observa que las redes de entrecruzamiento del termogel de quitosán/ β -GF tienen un ordenamiento mayor que en el caso del termogel de quitosán-PVA.

En las micrografías e y f tomadas a 1000x, se observa una microestructura muy fibrosa con largas áreas interconectadas entre las fibras. Se observa que durante la pérdida del agua de los termogeles de Qn-PVA y Qn/ β -GF la estructura de los poros se compactó. También se observó que el tamaño del poro es más compacto y en mayor número en el termogel de Qn-PVA. En el termogel de Qn/ β -GF el tamaño del poro es mayor pero la red alrededor del poro es muy cerrada. Sin embargo en la superficie de los termogeles se observó un efecto diferente debido a la pérdida de agua, mientras se forma la estructura fibrosa dentro de ellos, en la superficie se forma una película extendida. Esto se confirma con los estudios realizados por (K.E. Crompton *et. al.* 2005) que menciona que los hidrogeles forman películas extendidas debido a la deshidratación de las superficies durante la gelación.

3.2.2 Actividad 2. Análisis de Perfil de Textura (APT).

Se realizó un análisis de textura TPA (dureza, cohesividad, adhesividad, fuerza de fractura, elasticidad) para los termogeles tanto de Qn/ β -GF como de Qn-PVA, a cuatro diferentes concentraciones (1%, 2%, 3% y 5) usando un Texturómetro Lloyd TA 500, el cual se ilustra en la Fig. 20.



Fig20. Texturometro Lloyd TA 500

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis estadístico usando un análisis de varianza de dos factores, con un grado de significancia $\alpha= 0.05$ (ver anexo 2), representados en las siguientes gráficas:

DUREZA

Para analizar los datos obtenidos es importante definir la dureza como la fuerza necesaria para una deformación dada^{2,28}.

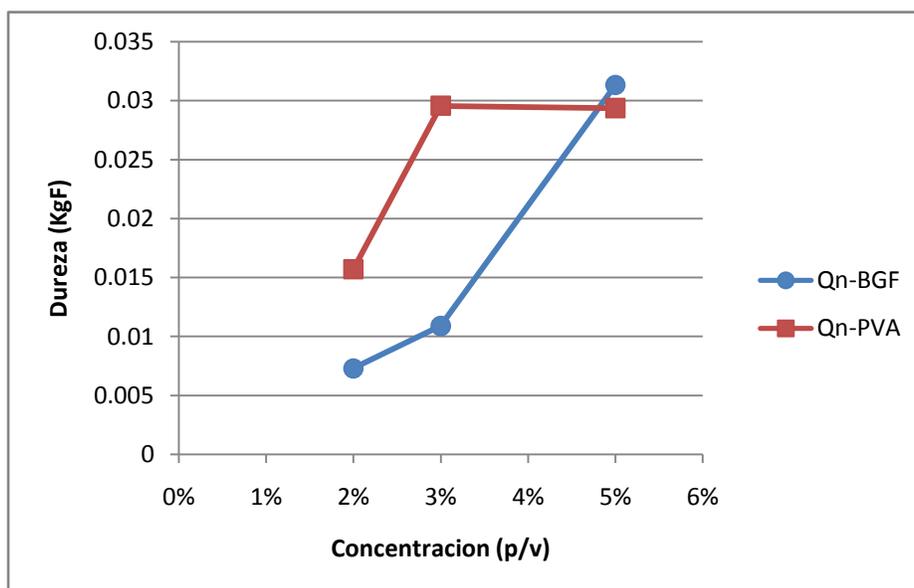


Gráfico 1 I) Dureza de los termogeles de Qn/ β -GF y Qn/PVA entre concentraciones de un mismo sistema con una $P= 4.94E-06$ y un grado de significancia de $\alpha=0.05$. II) Dureza entre los termogeles de Qn-PVA y Qn/ β -GF con una $P=0.0010$ y un grado de significancia de $\alpha=0.05$.



El análisis estadístico mostró que para los dos termogeles de Qn/ β -GF y Qn-PVA sí existe una diferencia significativa ($P=4.94 \text{ E-}06$) dependiente de las concentraciones del 2%, 3% y 5% de quitosán en el termogel.

El termogel de Qn-PVA presenta un aumento en la dureza al incrementar la concentración del 2% al 3% mientras que del 3% al 5% tiene un mínimo incremento en la dureza.

Para el termogel Qn/ β -GF la dureza tiene un aumento a la concentración del 2% al 3% mientras que del 3% al 5% presenta un incremento mayor, como se observa en la Gráfica 1.

Así mismo, el análisis estadístico mostró que entre la dureza de los dos termogeles sí existen diferencias significativas ($P=0.001$), en el gráfico 1 podemos observar que el termogel de Qn-PVA tiene valores mayores de dureza a la concentración del 2% Y 3% que el termogel de Qn/ β -GF.

COHESIVIDAD

De la prueba del análisis de perfil de textura se obtuvieron resultados de cohesividad la cual se define como que tanto puede deformarse un material antes de romperse^{2,28}.

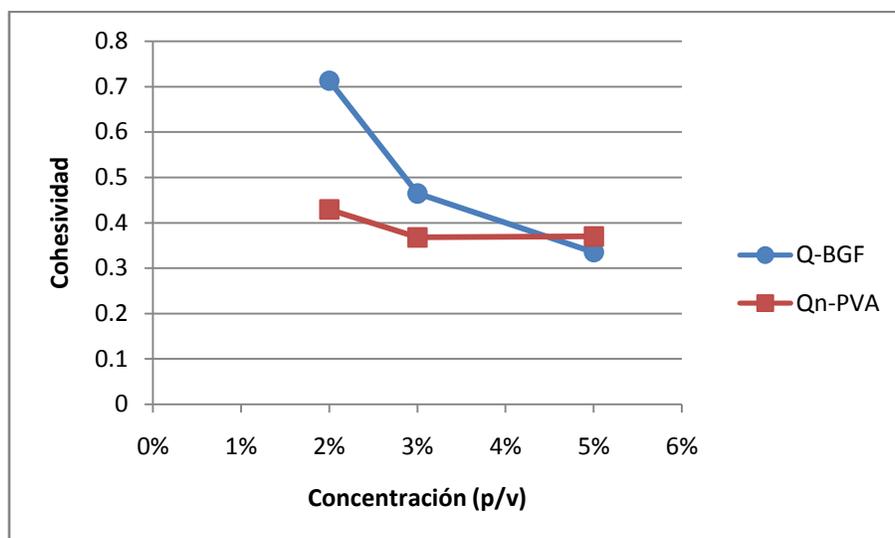


Gráfico 2 I) cohesividad de los termogel de Qn/ β -GF y Qn/PVA entre concentraciones de un mismo sistema con una $P= 0.0105$ y un grado de significancia de $\alpha=0.05$. II) Cohesividad entre los termogel de Qn-PVA y Qn/ β -GF con una $P=0.0444$ y un grado de significancia de $\alpha=0.05$.

El análisis estadístico mostró que para la cohesividad entre las concentraciones de los dos termogel de Qn/ β -GF y Qn-PVA sí existe una diferencia significativa ($P=0.0105$), cuando se modifican las concentraciones de quitosán del 2%, 3% y 5% en cada termogel.

La cohesividad en el termogel de Qn-PVA solo tiene una ligera disminución a la concentración del 2% al 5%; esta tendencia se mantiene con las concentraciones del 2 al 3%; mientras que del 3 al 5% se mantiene constante; como se observa en el Gráfico 2.

El termogel de Qn/ β -GF presenta una disminución mayor en la cohesividad al incrementar la concentración del quitosán del 2 al 5%; mientras que del 2 al 3% la disminución de la cohesividad es menor; con respecto a la concentración del quitosán del 3 al 5% presenta una tendencia similar a la concentración del 2 al 3%; como se observa en el Gráfico 2. A mayor concentración, menor cohesividad.

Así mismo el análisis estadístico mostró que entre la cohesividad de los dos termogeles sí existe diferencia significativa ($p=0.0444$), el termogel de Qn-PVA tiene valores más pequeños de cohesividad a la concentración del 2 y 3% que el termogel de Qn/ β -GF, pero a la concentración del 5% tienen los mismos valores y no hay diferencia en la cohesividad a esta concentración. (Ver anexo 1)

ADHESIVIDAD

Otro de los parámetros obtenidos del perfil de textura para los termogeles es la adhesividad, que es definida como el trabajo necesario para vencer las fuerzas de atracción entre la superficie del material y la superficie de los otros materiales con los que el termogel está en contacto^{2,28}.

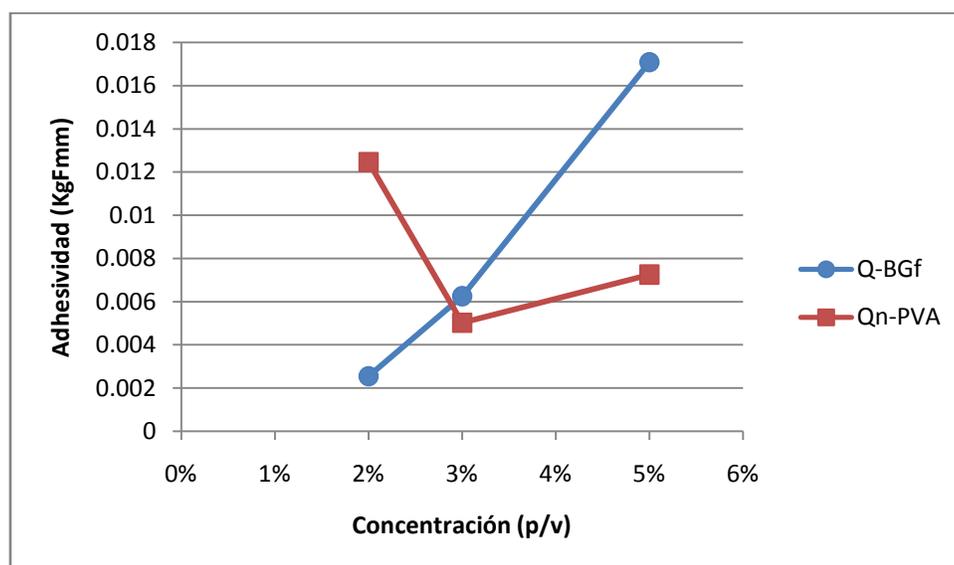


Gráfico 3 I) Adhesividad de los termogeles de Qn/ β -GF y Qn/PVA entre concentraciones de un mismo sistema con una $P= 0.0005$ y un grado de significancia de $\alpha=0.05$. II) Adhesividad entre los termogeles de Qn-PVA y Qn/ β -GF con una $P=0.7384$ y un grado de significancia de $\alpha=0.05$.

El análisis estadístico mostró que para la adhesividad en los dos termogeles de Qn/ β -GF y Qn-PVA sí existe una diferencia significativa ($P=0.0005$),



cuando se incrementan las concentraciones de quitosán del 2%, 3% y 5% en cada termogel.

El termogel de Qn-PVA presenta una disminución de la adhesividad al incrementar la concentración del quitosán del 2% al 3%, mientras que del 3% al 5% se incrementa la adhesividad. Como se observa en el gráfico 3.

La adhesividad en el termogel de Qn/ β -GF tiene un comportamiento contrario al termogel de Qn-PVA porque al aumentar la concentración de quitosán del 2% al 3% y del 3% al 5% mantiene un aumento constante en la adhesividad, como se observa en el Gráfico 3.

Por otro lado el análisis estadístico mostró que entre la adhesividad en los dos termogeles no existe diferencia significativa ($P= 0.7384$), para confirmar que no existe dicha diferencia significativa entre las medias de los termogeles se realizó un análisis de Tukey ($a= 2$ y $f=1$)¹, en donde se obtuvo que las diferencias de las medias de las concentraciones al 2% y las medias al 5% sí existe una diferencia significativa en la adhesividad y las medias de los dos termogeles a la concentración del 3% no existe una diferencia significativa en la adhesividad, por lo que se concluye que de manera global, solo existe diferencia significativa según el valor de Tukey entre dos concentraciones pero dicha diferencia es demasiado pequeña para que sea considerada como diferencia significativa con respecto al valor de la probabilidad.

FUERZA DE FRACTURA

Un parámetro importante para conocer la fuerza mecánica de los termogeles es la fuerza de fractura, la cual se define como la fuerza con la cual se rompe un material (alto grado de dureza y bajo de

¹ a= número de tratamientos
f= grados de libertad

cohesividad)^{2,28}. Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente Gráfica:

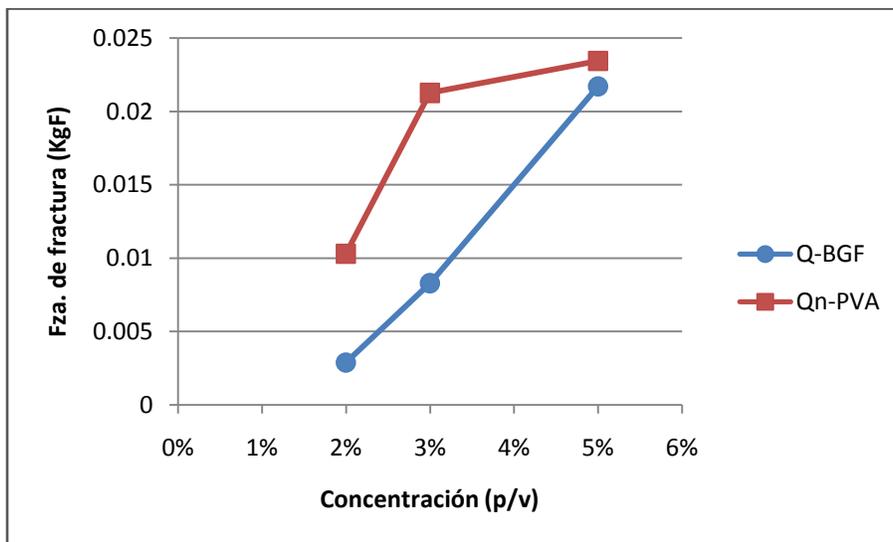


Gráfico 4 I) Fuerza de fractura de los termogeles de Qn/ β -GF y Qn/PVA entre concentraciones de un mismo sistema con una $P=0.0487$ y un grado de significancia de $\alpha=0.05$. II) Fuerza de fractura entre los termogeles de Qn-PVA y Qn/ β -GF con una $P=0.1476$ y un grado de significancia de $\alpha=0.05$.

El análisis estadístico mostró que para los dos termogeles de Qn/ β -GF y Qn-PVA sí existe una diferencia significativa ($P=0.0487$), cuando se incrementan las concentraciones de quitosán del 2%, 3% y 5% en cada termogel.

Los termogeles de Qn/ β -GF y Qn-PVA presentan un incremento de la fuerza de fractura al incrementar la concentración del quitosán del 2 al 3% y del 3 al 5%, sin embargo el termogel de Qn-PVA presenta mayor fuerza de fractura entre las concentraciones, como se observa en el Gráfico 4.

Los datos del análisis estadístico mostraron que entre la fuerza de fractura en los dos termogeles no existe diferencia significativa ($p=0.1476$), para confirmar que no existe diferencia significativa entre las medias de los

termogeles se realizó un análisis de Tukey ($a= 2$ y $f=1$)², donde se obtuvo que las diferencias entre las medias de las concentraciones al 2%, 3% y 5% no tiene una diferencia significativa en la fuerza de fractura según el valor de Tukey por lo que se concluye de manera global que no hay diferencia significativa entre los dos termogeles en este parámetro textural en particular.

ELASTICIDAD

El último de los parámetros obtenidos fue la elasticidad que se define como la tasa a la cual un material deformado regresa a su condición inicial después de retirar la fuerza deformante^{2,28}.

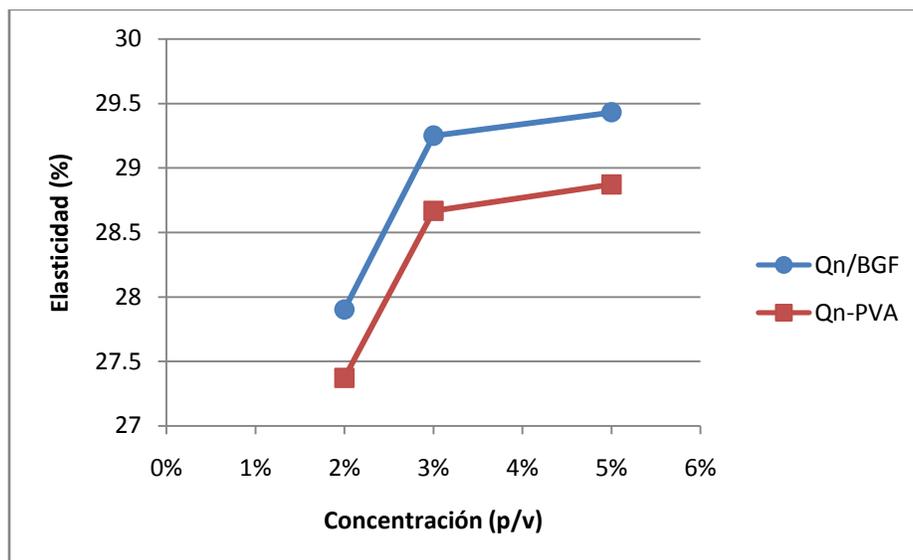


Gráfico 5 I) Elasticidad de los termogeles de Qn/ β -GF y Qn/PVA entre concentraciones de un mismo sistema con una $P= 0.0097$ y un grado de significancia de $\alpha=0.05$. II) Elasticidad entre los termogeles de Qn-PVA y Qn/ β -GF con una $P= 0.1667$ y un grado de significancia de $\alpha=0.05$.

² a= número de tratamientos
f= grados de libertad



El análisis estadístico mostró que para los dos termogeles de Qn/ β -GF y Qn-PVA sí existe una diferencia significativa ($P= 0.0097$), cuando aumentan las concentraciones de quitosán del 2%, 3% y 5% de cada termogel.

Los termogeles de Qn/ β -GF y Qn-PVA presentan un incremento en la elasticidad al incrementar la concentración del quitosán del 2 al 3% y del 3 al 5%, sin embargo el termogel de Qn/ β -GF presenta mayor elasticidad entre las concentraciones, como se observa en el Gráfico 5.

Por otro lado el análisis estadístico mostró que la elasticidad entre los dos termogeles no existe diferencia significativa ($p= 0.1667$), para confirmar que no existe diferencia significativa entre las medias de los termogeles se realizó un análisis de Tukey ($a= 2$ y $f=1$)³, en donde se obtuvo que las diferencias entre las medias de las concentraciones al 2%, 3% y 5% no tiene una diferencia significativa según el valor de Tukey por lo que se concluye de manera global no hay diferencia significativa entre los dos termogeles en este parámetro en particular.

3.3.3 Actividad 4. Calorimetría diferencial de barrido.

La calorimetría diferencial de barrido permite el estudio de aquellos procesos en los que se produce una variación entálpica, por ejemplo la determinación de los calores específicos, entalpías de reacción y la determinación de otras transiciones. En el campo de polímeros pueden determinarse transiciones térmicas como la temperatura de transición vítrea T_g , así como nos da información sobre los cambios de entalpía y de calor

³ a= número de tratamientos
f= grados de libertad



específico que acompañan a las transiciones conformacionales de los polímeros (González B.F.J. 2008).

Uno de los parámetros importantes para el objetivo de este estudio es la temperatura de transición vítrea (T_g); ésta se define como la temperatura a la cual un polímero cambia de un estado rígido y quebradizo a otro blando y maleable. La transición vítrea se manifiesta en los polímeros *amorfo*s; es decir, polímeros cuyas cadenas no están dispuestas en un ordenamiento cristalino, sino que están esparcidas en cualquier forma, aún en estado sólido⁵⁴.

La temperatura de transición vítrea (T_g) se observa como un pico en la gráfica de flujo de calor total (gráfica 6); esta gráfica nos muestra los cambios globales que ocurren en ambos termogeles, es decir, el flujo de calor reversible (cambios estructurales) y el flujo de calor irreversible (cambios cinéticos) que ocurren.

Los termogeles de Q/ β -GF y Q-PVA al 2% (p/v) fueron analizados mediante DSC de flujo de calor, donde se obtuvo el siguiente gráfico de flujo de calor total:

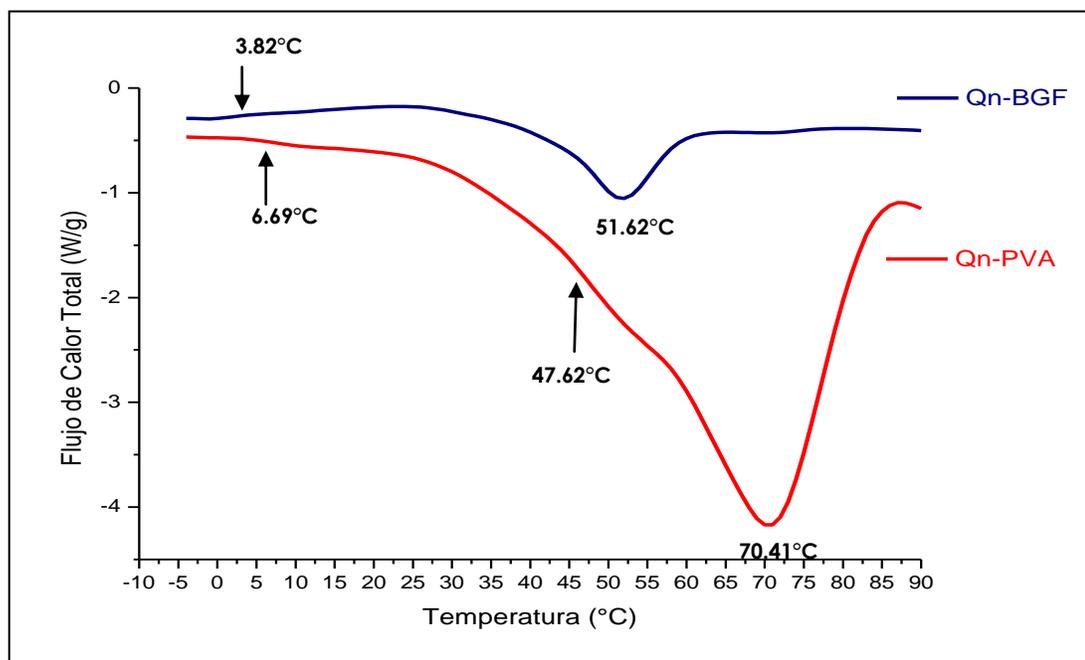


Gráfico 6. Termograma del flujo de calor total de los termogel de Qn/ β -GF y Qn-PVA al 2% (p/v).

El gráfico 6 presenta los cambios globales que ocurren en el termogel de Qn/ β -GF, primero se presenta un cambio térmico a 3.82°C a esta temperatura se dan interacciones hidrofóbicas del quitosán- quitosán que debe ser aumentado por la acción estructurada del glicerol en el agua. (Chenite, *et al.* 2000).

El termogel de Qn/ β -GF presenta una temperatura de transición vítrea a 51.62°C con una cambio entálpico de 104.8 J/g, en el termograma se observa como un pico endotérmico. Al llegar a esa temperatura se tiene la formación del termogel.

Otros investigadores como (Chenite *et al.*, 2000) realizaron estudios en mezclas de quitosán/ β -glicerofosfato encontrando la temperatura de gelación a \sim 45°C. De acuerdo a estos investigadores el parámetro de la temperatura de gelación está influenciado por el pH final de la mezcla. (Chenite *et. al.*, 2000) demostró que soluciones de Qn/ β -GF con valores de



pH de 6.5-6.9 son completamente termorreversibles y que el pH bajo inhibe la formación de enlaces de hidrogeno debido a la fuerte presencia de repulsión electrostática intercatenaria que da como consecuencia el desplazamiento de la temperatura de gelación. Por otro lado (Chenite *et al*, 2001) realizó un nuevo estudio de soluciones de Qn/ β -GF demostrando la influencia del pH en la temperatura de gelación en donde encontró que soluciones a pH de 6.85 tienen una temperatura de gelación cercana a los 50°C mientras que soluciones que se acercan a pH de 7.2 tienen una temperatura de gelación de ~ 37°C. Demostró también que un incremento en el pH ayuda a reducir la densidad de carga de las cadenas de quitosán y por tanto reducen la repulsión electrostática permitiendo la disminución en la temperatura de gelación y por ende ayudando a la formación del termogel. En nuestro estudio la temperatura de gelación fue a 51.62°C esto fue debido al valor de pH final de la mezcla de quitosán/ β -glicerofosfato~(pH = 7.3).

Para el termogel de Qn-PVA el termograma muestra tres transiciones globales importantes como se observa en la gráfica 6.

La primera transición térmica se presenta a 6.69°C donde el termogel tuvo un requerimiento de energía para realizar un reordenamiento de la estructura, para con esto promover la formación de los enlaces puente de hidrógeno entre el quitosán y el alcohol polivinílico (Tang *et. al.*, 2007).

La segunda transición térmica es a 47.62 °C a ésta temperatura el quitosán y el alcohol polivinílico tienen el posicionamiento estructural necesario para iniciar la formación de las interacciones hidrofóbicas y por lo tanto de la red de entrecruzamiento del termogel.

El termogel de Qn-PVA presenta una temperatura de transición vítrea de 70.41 °C con una entalpia de 979.5 J/g, como se muestra en el termograma; a esta temperatura se tiene la formación de la red de



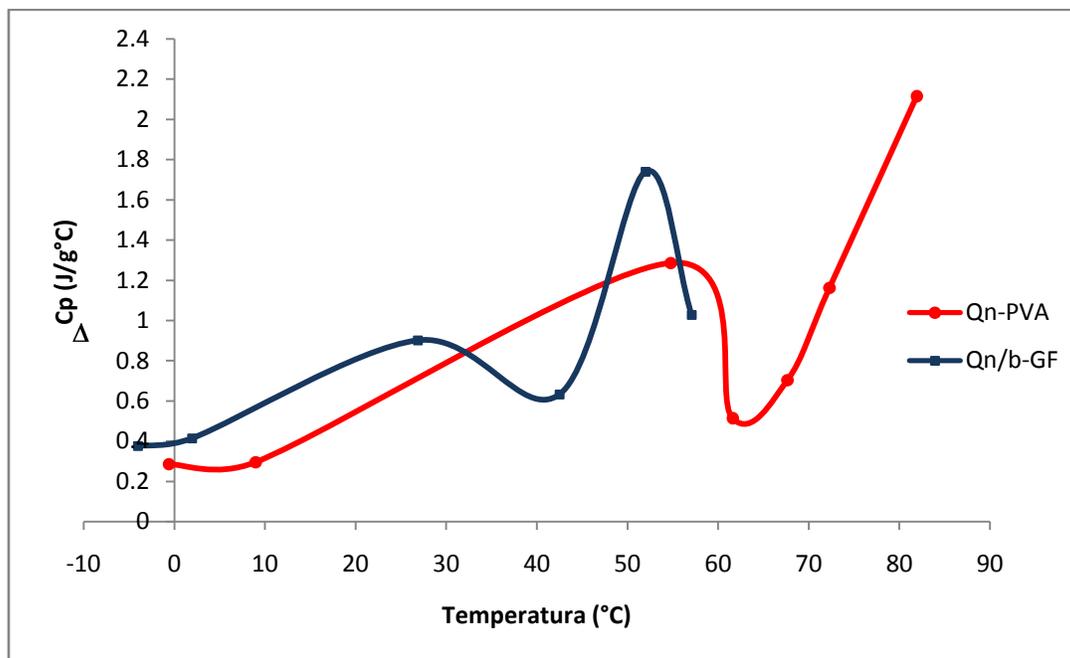
entrecruzamiento, investigaciones realizadas por (Gonzales, Álvarez, 2009) obtuvieron un termogel de Quitosán/PVA por un método de congelamiento-descongelamiento y mencionan que la temperatura de transición vítrea que obtuvieron fue de 72°C, por lo que a pesar de haber utilizado un método diferente para la formación del termogel, el valor de la temperatura de transición vítrea tiene una diferencia de 2 grados, esto pudo derivarse del valor de pH final de la mezcla(≈ 7.3) y/o a las condiciones a las que se corre la muestra en el calorímetro.

Como se puede observar de los valores de las entalpías, es mayor la cantidad de energía requerida para la formación de los geles de Qn-PVA ($\Delta H=979.5$ J/g,) que para los de Qn/ β -GF ($\Delta H=104.8$ J/g), esto es debido al tipo de enlace que tienen cada uno de los termogeles; en el caso del Qn-PVA es un enlace de tipo interpolimérico y en el Qn/ β -GF es un enlace tipo iónico.

Capacidad calorífica

Uno de los parámetros importantes que podemos obtener de un DSC es la *capacidad calorífica*; que se define como la cantidad de calor necesaria para elevar la temperatura de un gramo de cualquier material un grado Celsius⁵⁴.

En la Gráfica 7 muestra los cambios en la capacidad calorífica debido al cambio estructural de los termogeles de quitosán/ β -glicerofosfato y quitosán-alcohol polivinílico.



Gráfica 7. Termograma de la Capacidad Calorífica de los termogel de Qn/β-GF y Qn-PVA al 2%(p/v).

Como se observa en la Gráfica 7, los movimientos estructurales ocurren primero en el termogel de quitosán/β-glicerofosfato, este primer cambio en la curva se refleja como un cambio exotérmico, al aumentar la temperatura se observa cómo cambia el gráfico del ΔC_p de ambos sistemas, para el sistema de Qn/β-GF conforme se incrementa la temperatura la gelación aparece y se tiene el punto más alto de la curva que es donde se requiere la mayor cantidad de calor para llegar a la temperatura de 51.96°C, con un ΔC_p de 1.74 J/g°C. Esta temperatura de transición es la misma que se observa en la gráfica 6 de flujo de calor total; en este punto se tiene la formación completa del termogel.



Capacidad calorífica del termogel de quitosán-alcohol polivinílico.

Los cambios estructurales que ocurren en el termogel de Qn-PVA se muestran en el termograma del gráfico 7, en éste, se observan las transiciones termosensible sol-gel. La transición se observa en la gráfica 7 como un pico exotérmico, en donde se llevan a cabo diferentes tipos de interacciones para lograr la formación del termogel de Qn-PVA. En la gráfica no se observa la temperatura de transición como en el caso del sistema de Qn-BGF sino que la temperatura de transición se encuentra enmascarada por la evaporación del agua. Esto se observa al final del pico exotérmico entre los 60-75°C, a la temperatura de transición vítrea de 70°C se tiene un ΔC_p de 1.163 J/g°C, para tener finalmente la formación de la red de entrecruzamiento del gel.

3.3.5 ACTIVIDAD 4. Degradación *in vitro* de los termogeles de quitosán.

Se realizó un análisis fotográfico de la degradación *in vitro* de los termogeles de quitosán por 30 días. En la Fig. 21 y Fig. 22 se muestran los termogeles de Q/BGF y Q-PVA respectivamente formados antes de iniciar la degradación.



Fig.21 Termogel de Qn/β-GF sin degradar



Fig.22 Termogel de Qn-PVA sin degradar

Primera semana

En la primera semana se observó que al adicionar el termogel de quitosán-β-GF a la solución buffer de fosfatos a pH 7.4 conteniendo 4mg mL⁻¹ de lisozima el gel inmediatamente se fragmento al añadirse a la solución buffer, a comparación del termogel de quitosán-PVA.



Fig. 23 Termogel de Qn/β-GF semana 1



Fig.24 Termogel de Qn-PVA semana 1

Segunda semana.

Se observó que en el termogel de quitosán- β glicerofosfato quedaban unas trazas de gel mientras que en el termogel de quitosán-PVA todavía se encontraba en mayor cantidad como gel.



Fig. 25 Termogel Qn/ β -GF semana 2



Fig. 26 Termogel Qn-PVA semana 2

Tercera semana.

Para la tercera semana el termogel de quitosán- β glicerofosfato se encuentra casi en su totalidad degradado; mientras que el termogel de quitosán-PVA la degradación fue más lento, debido a que se observó gran cantidad del termogel en la solución buffer.



Fig. 27 Termogel Qn/ β -GF semana 3



Fig. 28 Termogel Qn-PVA semana 3

Comparando ambos termogeles se comprobó que el termogel de Quitosán/ β -GP se degrada más rápido que el termogel de quitosán-PVA.

3.4 ETAPA 3 IMPLANTE DE LOS TERMOGELES DE QUITOSÁN EN RATAS.

Extracción del remanente del implante del termogel quitosán-PVA.

Se usaron dos ratas que fueron inyectadas subcutáneamente en el área peritoneal con una dosis de 300 μ l c/u de una solución de termogel de quitosán-PVA y quitosán/ β -glicerofosfato de sodio respectivamente; para realizar la degradación *in vivo* del termogel, como se muestra en la Fig. 29.



Fig. 29 Inyección el implante del termogel de Qn-PVA

Se extrajo el remanente del implante del termogel que quedó en la rata después de 5 días de ser implantado.

Se determinó al momento de la extracción que la degradación del termogel no fue completa, como se muestra en la Fig. 30, en donde se observa el aspecto del implante remanente.

A este remante del termogel se le tomó una micrografía SEM a 10000x como se observa en la Fig. 31. Está micrografía muestra la degradación de las cadenas de entrecruzamiento del termogel implantado.

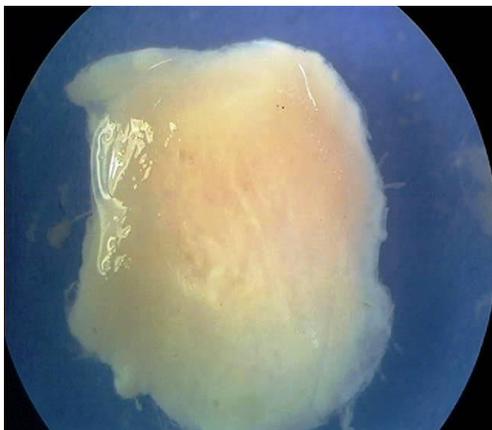


Fig.30 Remanente del termogel de quitosán-PVA implantado en ratas.

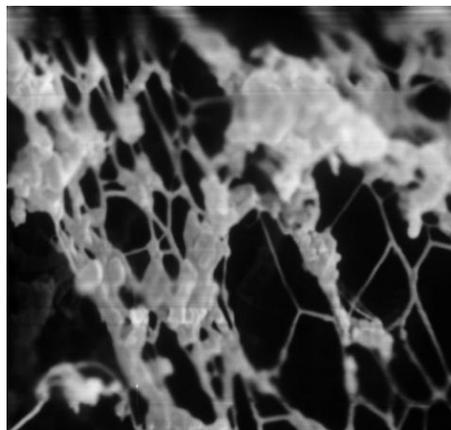


Fig.31 Micrografía de la red de entrecruzamiento degradada del remanente del termogel Qn-PVA a 10000x

En la micrografía de la Fig. 31 se observa el termogel de Qn-PVA degradado, con huecos más grandes; ya no se observa en la red las uniones cerradas sino rotas, en comparación con la micrografía del termogel de Qn-PVA en la Fig. 19 (f) en donde los poros son más cerrados y la red más compacta.

Extracción del remanente del implante del termogel de quitosán/ β -glicerofosfato.

Después de 5 días de ser inyectado la solución de quitosán/ β -GF se procedió a abrir la rata para extraer el remanente, observándose que sí se formó el termogel dentro de la rata.

Al remanente extraído se le tomó una micrografía SEM a 10 000 x como se muestra en la Fig. 32.

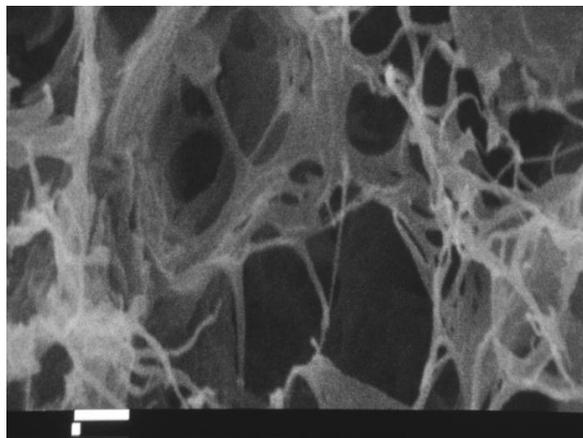


Fig.32 Micrografía de la red de entrecruzamiento degradada del remanente del termogel Qn/ β -GF a 10000x

La micrografía muestra a la red de entrecruzamiento parcialmente degradada, es decir, ya no se observan los poros de manera homogénea, la red se observa fragmentada; comparado con las micrografías a y c (ver Fig. 19) en donde se observan los poros de manera homogénea.

DISCUSIÓN

Los termogeles de quitosán/ β -glicerofosfato y quitosán-alcohol polivinílico muestran diferencias en cuanto a sus propiedades texturales esto puede deberse a la formación de los enlaces en los termogeles. Los termogeles de quitosán/ β -glicerofosfato se forman a partir de enlaces iónicos e interacciones hidrofóbicas, mientras que los termogeles de quitosán-PVA se forman mediante enlaces (Berger, 2004)

Una forma de representar estas interacciones en el termogel de quitosán-PVA se muestra en la Fig. 33:

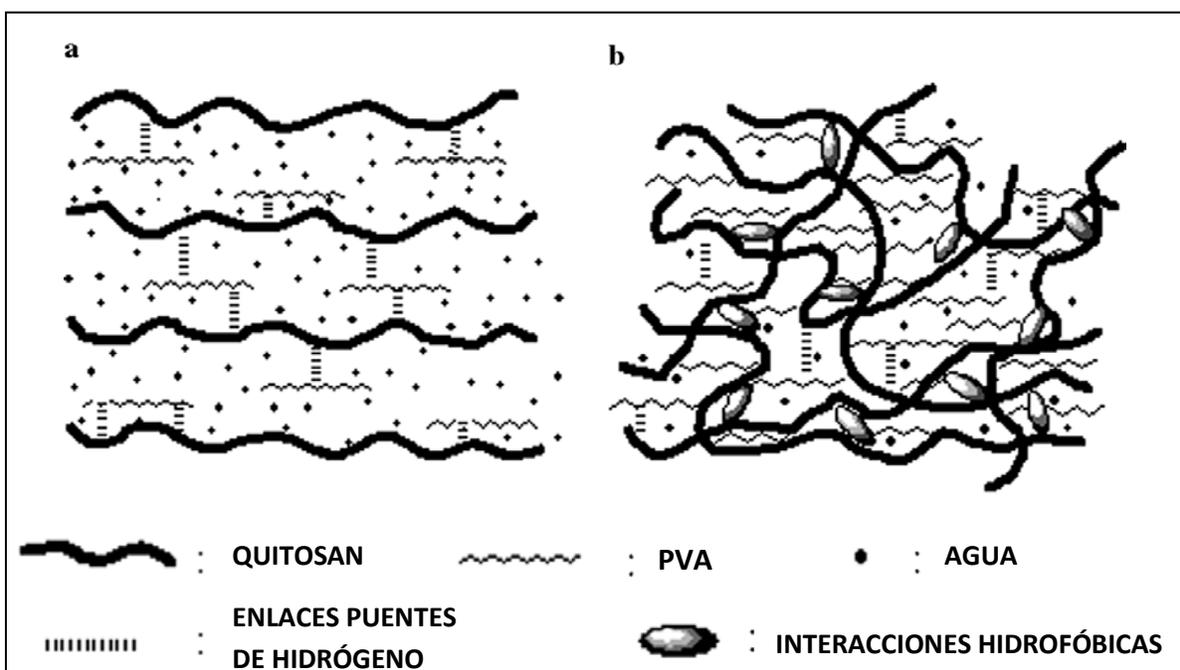


Figura 33. Mecanismo de formación del termogel de quitosán-PVA. (a) Mezcla de Qn-PVA a bajas temperaturas (b) Formación del gel de Qn-PVA al incrementarse la temperatura (Tang, 2007).

Como se observa en la Fig. 33(a) cuando la mezcla de quitosán-PVA está a bajas temperaturas, los grupos amino libres del quitosán ($-\text{NH}_2$) son protonados como ($-\text{NH}_3$) por el medio rico en agua. Al mismo tiempo con



el incremento del pH por el NaHCO_3 , se reduce la repulsión electrostática que subsecuentemente permite las interacciones de enlace puentes de hidrógeno entre las cadenas del quitosán y el alcohol polivinílico.

A medida que se incrementa la temperatura de la mezcla de quitosán-PVA, se promueve la reducción de las interacciones intermoleculares de los enlaces puente de hidrogeno, esto acelera la movilidad de las cadenas de quitosán. Al tener mayor movilidad el quitosán, las moléculas de agua que tiene alrededor son energizadas para finalmente ser removidas.

Las cadenas de quitosán ya con menor presencia de agua alrededor, hay un reacomodo estructural que permite se desarrollen las interacciones hidrofóbicas y se asocian entre sí (Fig. 33 b), para tener finalmente la formación del gel. Por lo que las interacciones hidrofóbicas se consideran las principales fuerzas para la formación del gel (Tang *et. al.* 2007). Después de que el termogel se forma observamos una desorción en los geles de Qn-PVA al 2%, 3% y 5% ésta presencia de agua en la superficie del termogel es debido al fenómeno de la sinéresis.

La sinéresis se presenta comúnmente en los geles, y consiste en una exudación de la fase acuosa que elimina parte del agua constituyente del gel. La sinéresis implica una contracción del gel, lo que origina la expulsión del agua ya mencionada anteriormente. Esta contracción se debe a un reacomodo físico de las macromoléculas que adquieren una estructura más estable y provocan un ajuste en las interacciones soluto-disolvente. La sinéresis está influenciada por factores como la concentración del coloide, el pH, y cambio de temperatura como es nuestro caso (Baduí, 2006).

El mecanismo de gelación del termogel de quitosán/ β -glicerofosfato es un proceso complejo en el que intervienen varios tipos de interacciones como se observa en la Fig. 34.

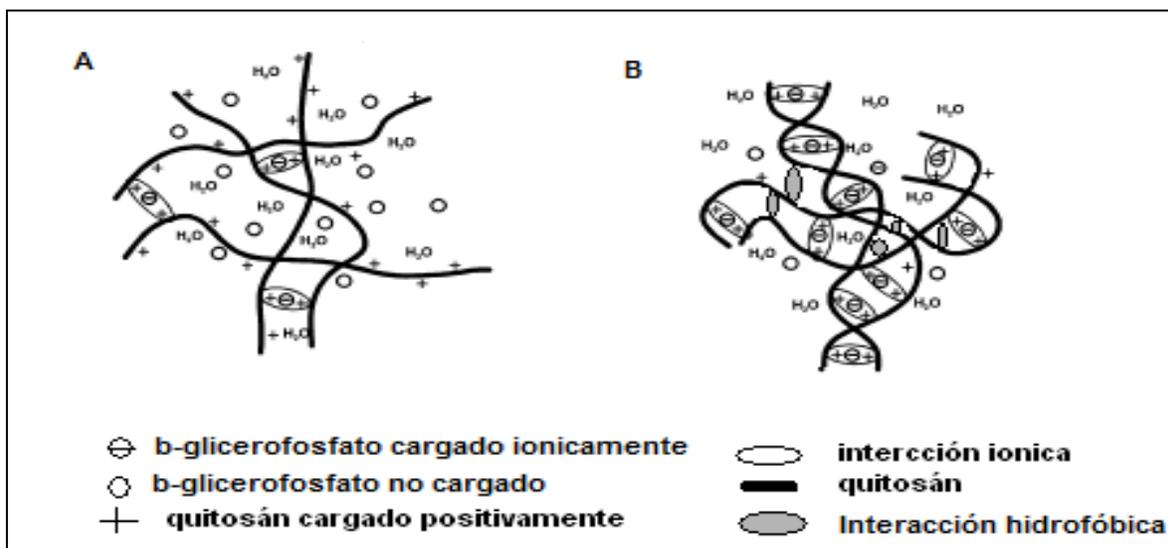


Fig. 34 Mecanismo de formación del termogel de quitosán/ β -glicerofosfato. (A) Mezcla de Qn- β GF a bajas temperaturas (B) Formación del gel de Qn/ β -GF al incrementarse la temperatura (Berger *et al*, 2003).

Al considerar el mecanismo de gelación para este sistema, es importante tener en mente la amplia gama de interacciones que pueden ocurrir en soluciones acuosas del polielectrolito catiónico de quitosán y la base aniónica divalente de glicerofosfato incluyendo: 1) Atracción electrostática entre el grupo amonio del quitosán y el grupo fosfato del glicerofosfato, 2) enlaces de hidrogeno entre las cadenas del quitosán como consecuencia de la reducción de la repulsión electrostática después de la neutralización de la solución de quitosán con glicerofosfato, 3) las interacciones hidrofóbicas entre quitosán-quitosán(Ruel Gariepy, *et al*. 2000); y 4) la hidrofobicidad o el carácter del agua estructurado de la parte glicerol del glicerofosfato(Chenite, *et al*. 2001).



De los parámetros texturales se obtuvo que el termogel de Qn/ β -GF presentó mayor cohesividad, adhesividad y elasticidad y para el termogel de Qn-PVA tuvo mayor dureza y fuerza de fractura.

Es importante mencionar que las características mecánicas que tendrá un termogel dependen del pH final de la mezcla y de la temperatura. En las investigaciones realizadas por (Martien, *et al.* 1986) menciona que los termogeles de quitosán-alcohol polivinílico presentaron excelente fuerza mecánica, corroborándolo con el hecho de que los geles de quitosán-alcohol polivinílico presentaron mayor dureza y fuerza de fractura, debido a que en su estructura (ver Fig. 33.) presenta mayor número de enlaces hidrofóbicos y eso hace que la red sea más cerrada. Los resultados obtenidos en microscopia electrónica mostraron que el tamaño del poro de los termogeles de quitosán/ β -GF es mayor (42.5 micras) y que en los termogeles de quitosán-PVA (30 micras). Al tener esta diferencia en el tamaño de poro es de suponer que el gel de Qn/ β -GF tuvo mayor cohesividad, adhesividad y elasticidad al ser su poro más grande permitiendo a la red de entrecruzamiento mayor flexibilidad y agarre o adhesión en una superficie. En el caso del termogel de Qn-PVA que presentó un tamaño de poro menor, esto provocó en la red de entrecruzamiento mayor rigidez lo cual se vio reflejado en los parámetros texturales con una mayor dureza y fuerza de fractura, y al mismo tiempo presentando una menor adhesión, cohesividad y elasticidad.



En relación a la capacidad calorífica, nos indica el movimiento estructural de los sistemas de Qn-PVA y Qn/ β -GF tenemos que: Para el sistema de Qn/ β -GF los resultados de capacidad calorífica mostraron dos picos exotérmicos (Gráfico 7) los cuales pueden ser explicados mediante el mecanismo de gelación antes mencionado. Como se observa en la Gráfico 7, los movimientos estructurales ocurren primero en el sistema de quitosán/ β -glicerofosfato. Este primer cambio en la curva se refleja como un cambio exotérmico, esto se refiere al reacomodo estructural del quitosán y el β -glicerofosfato para lograr la disposición de las estructuras que permita la formación de los enlaces; debido a que cuando se mantiene la solución de quitosán/ β -glicerofosfato a bajas temperaturas no se vuelve inmediatamente un gel, se realiza gradualmente conforme se incrementa la temperatura. Ruel, et al. 2000, parten de la idea de que la parte polirol del glicerofosfato previene o disminuye la gelación a baja temperatura. Se conoce además que los polioles estabilizan ciertos compuestos en solución acuosa y promueven la formación de un escudo protector de agua alrededor de algunas macromoléculas en mezclas polirol-agua, y postulan que la adición de glicerofosfato a la solución del quitosán promueve una hidratación protectora de las cadenas de quitosán. Por tanto, a bajas temperaturas, previene su asociación para formar un gel, aun a pH neutro.

En la Gráfica 7, al aumentar la temperatura se observa cómo cambia el gráfico del ΔC_p de ambos sistemas, para el sistema de Qn/ β -GF conforme se incrementa la temperatura la gelación aparece. Esto implica que algunas fuerzas repulsivas entre las cadenas del quitosán son estabilizadas a baja temperatura y debilitadas a alta temperatura. (Ruel, Gariepy et al, 2000).



Conforme se sigue incrementando la temperatura se tiene el punto más alto de la curva que es donde se requiere la mayor cantidad de calor para llegar a la temperatura de 51.96°C, con un ΔC_p de 1.74 J/g·°C. Esta temperatura de transición es la misma que se observa en la gráfica 6 de flujo de calor total; en este punto se tiene la formación completa del termogel. Chenite, et al. 2000 en sus estudios de termogeles de Qn/b-GF postulan que el aspecto trivial de esta gelación, es decir, su dependencia de la temperatura, la mayoría se origina fundamentalmente del fortalecimiento de la atracción hidrofóbica del quitosán al aumentar la temperatura, debido a la presencia de la parte glicerol. A bajas temperaturas, las fuertes interacciones entre el quitosán y el agua protegen a las cadenas de quitosán contra la agregación. Al calentarse, el escudo de las moléculas de agua es eliminada por el glicerol, que a su vez permite la asociación de macromoléculas de quitosán. Así, aunque las fuerzas electrostáticas pueden ser moduladas por la temperatura, ya sea a través de la conformación de acoplamiento de cargas o debido a la correlación de los iones divalentes, se espera que las interacciones hidrofóbicas desempeñen un papel importante en la gelificación de la solución de Qn/GF.

Los cambios estructurales que ocurren en el sistema de Quitosán-alcohol polivinílico se muestran en el termograma del gráfico 7, en éste se observan las transiciones termosensible sol-gel que son llevadas a cabo por el polihidroxipolímero PVA, el cual puede estabilizar ciertos compuestos y promover la formación de un escudo de agua alrededor de algunas macromoléculas en solución acuosa. La transición se observa en la gráfica 7 como un pico exotérmico, que se refiere al reacomodo estructural que ocurre tanto en el quitosán como en el alcohol polivinílico, en los estudios realizados por (Tang *et. al.* 2007), menciona que cuando la mezcla de PVA



y NaHCO_3 es añadida a bajas temperaturas, los enlaces hidrogeno existen no solo entre los grupos OH de PVA sino también entre los OH y los grupos NH_2 del quitosán, así como también entre el PVA y el agua, debido a que el PVA es altamente hidrofílico lo que provoca cierta repulsión electrostática entre las cadenas.

Al estar la mezcla de quitosán-PVA a bajas temperaturas, los grupos amino libres del quitosán ($-\text{NH}_2$) son protonados como ($-\text{NH}_3$) por el medio rico en agua. Al mismo tiempo con el incremento del pH el NaHCO_3 reduce la repulsión electrostática, que subsecuentemente permitirá las interacciones de enlace de hidrógeno entre las cadenas del quitosán y el alcohol polivinílico; y también se promueve la reducción de la movilidad de las moléculas de quitosán, el cual retarda la asociación entre las cadenas. Esto crea una estructura de red tridimensional pobre debido a la dificultad de crear contacto entre las uniones de las cadenas.

Conforme la temperatura se va elevando, las interacciones de los enlaces de hidrogeno intermolecular son reducidas gradualmente y las moléculas de agua alrededor del quitosán son removidas. A consecuencia de esto se acelera la movilidad de las cadenas de quitosán.

Las cadenas de quitosán ya con menor presencia de agua alrededor, hay un reacomodo estructural que permite se desarrollen las interacciones hidrofóbicas y se asocian entre sí, dichas interacciones se observan en el Gráfico 7 al final del pico exotérmico entre los $60-75^\circ\text{C}$ con un ΔC_p de $1.163 \text{ J/g}^\circ\text{C}$ junto con la liberación del agua. Para tener finalmente la formación de la red de entrecruzamiento del gel. Por lo que se confirman los resultados obtenidos de los estudios realizados por (Tang, Kennedy, *et al.* 2007) en donde asumen que las interacciones hidrofóbicas son la principal fuerza de manejo para la consistencia del gel de quitosán-PVA a altas temperaturas.



Después de que el termogel se forma observamos una desorción en los geles de Qn-PVA ésta presencia de agua en la superficie del termogel es debido al fenómeno de la sinéresis.

La sinéresis implica una contracción del gel, lo que origina la expulsión del agua ya mencionada anteriormente. Esta contracción se debe a un reacomodo físico de las macromoléculas que adquieren una estructura más estable y provocan un ajuste en las interacciones soluto-disolvente (Baduí, 2006).

Como se observa en el Gráfico 7 el cambio estructural del termogel de Qn-PVA necesita una mayor cantidad de calor suministrado para que se den dichos cambios, observándose como un pico exotérmico, esto puede deberse a la gran cantidad de agua que absorbe el termogel seguido de la subsecuente exudación de parte del agua, esto provoca un enmascaramiento de los picos, siendo más evidente al final del pico exotérmico donde se desplaza ligeramente la temperatura de transición vítrea por lo que no se observa en el punto máximo de la curva.

Por el contrario en el termogel de Qn/ β -GF no ocurre esto, debido a que tiene una mínima exudación de agua, reflejándose en los picos del ΔC_p solamente el cambio estructural del termogel, y se tiene la misma temperatura de transición vítrea que en la curva de flujo de calor total (Gráfico 6).

Los mecanismos propuestos por diferentes autores para los sistemas de quitosán-alcohol polivinílico y quitosán/ β -glicerofosfato de sodio coinciden en que las interacciones hidrófobas son las que juegan un rol importante para que se dé la formación de los termogeles.



4. CONCLUSIONES.

- Se logró la formación de los termogeles de quitosán-alcohol polivinílico y quitosán/ β -glicerofosfato a pH neutro y a una temperatura de 37°C.
- El peso molecular del quitosán empleado no influye en la formación de los termogeles.
- Se obtuvo la concentración de quitosán idónea la cual fue del 2% (p/v), para ser inyectada como un implante medicinal.
- El análisis morfológico mostró que el termogel de quitosán/ β -glicerofosfato obtenido, tiene un tamaño de poro promedio más grande que el de quitosán-PVA siendo de 42.5 micras y de 30 micras respectivamente.
- En el análisis de perfil de textura mostró que los termogeles de quitosán/ β -glicerofosfato tuvieron mayor cohesividad y elasticidad y baja fuerza de fractura, adhesividad y dureza. Sin embargo, los termogeles de quitosán-alcohol polivinílico mostró mayor dureza, adhesividad y fuerza de fractura y baja cohesividad y elasticidad. Dependerá del lugar de implantación se escogerá el que mejor se adecue a los requisitos de implantación.
- En el análisis de calorimetría diferencial de barrido se obtuvieron las temperaturas de transición vítrea para ambos termogeles con su respectivo cambio entálpico, para el termogel de quitosán/ β -glicerofosfato fue de 51.62°C con $\Delta H=104.8$ J/g y para el termogel de quitosán-alcohol polivinílico fue de 70.41°C con un $\Delta H=979.5$ J/g, esto significa que a la temperatura de 37°C el termogel de quitosán/ β -glicerofosfato estará formado en un 72% y el termogel de quitosán-alcohol polivinílico en un 53%, por lo tanto el termogel que estará más cercano a su formación total de la red es el de quitosán/ β -glicerofosfato.
- En el mismo análisis de calorimetría diferencial de barrido se obtuvieron los cambios estructurales que se muestran en la medición de la capacidad calorífica de ambos termogeles. Para termogel



quitosán/ β -glicerofosfato, tomando en cuenta su T_g a 51.96°C tiene $\Delta C_p=1.74 \text{ J/g } ^\circ\text{C}$. Mientras que el termogel de quitosán-alcohol polivinílico tomando en cuenta su T_g a 70°C tiene un $\Delta C_p=1.163 \text{ J/g}^\circ\text{C}$, por lo que se requiere mayor cantidad de calor para formar el termogel quitosán/ β -glicerofosfato.

- El termogel de quitosán/ β -glicerofosfato se degrada más rápido que el termogel de quitosán-alcohol polivinílico. Esto se atribuye a la disposición de la red de entrecruzamiento de cada termogel, debido a que la red del gel quitosán/ β -glicerofosfato es más abierta facilita en mayor grado la acción de la lisozima; Sin embargo para el gel quitosán-alcohol polivinílico presenta una red más compactada y con mayor dureza y eso limita la acción de la lisozima.
- Se logró implantar ambos sistemas de quitosán-alcohol polivinílico y quitosán/ β -glicerofosfato en ratas donde comprobó la formación de los termogeles en un organismo vivo, extrayendo el remanente después de 5 días. Por medio de microscopia electrónica se comprobó la degradación parcial de ambos sistemas.
- El termogel a utilizar dependerá del lugar de implantación y se escogerá el que mejor se adecue a los requisitos de implantación.



ANEXO 1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DEL PERFIL DE TEXTURA (APT).

Análisis estadístico de dos factores, diseño completamente aleatorio.

DUREZA

Análisis estadístico para el Qn/ β -GF y Qn-PVA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	0.00041917	1	0.00041917	15.31721268	0.001017815	4.413873405
Columnas	0.001421973	2	0.000710986	25.98066841	4.94003E-06	3.554557146
Interacción	0.000425396	2	0.000212698	7.77235009	0.003688394	3.554557146
Dentro del grupo	0.000492588	18	2.7366E-05			
Total	0.002759126	23				

COHESIVIDAD.

Análisis estadístico para el Qn/ β -GF y Qn-PVA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	0.079465042	1	0.079465042	4.668627406	0.044446143	4.413873405
Columnas	0.202095976	2	0.101047988	5.936640765	0.010469023	3.554557146
Interacción	0.102130231	2	0.051065115	3.000111651	0.075078399	3.554557146
Dentro del grupo	0.30637929	18	0.017021072			
Total	0.690070538	23				

ADHESIVIDAD

Análisis estadístico para el Qn/ β -GF y Qn-PVA.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	8.81667E-07	1	8.81667E-07	0.115087567	0.738350599	4.413873405
Columnas	0.000180756	2	9.03779E-05	11.7974002	0.000532232	3.554557146
Interacción	0.000391201	2	0.0001956	25.53252475	5.54789E-06	3.554557146
Dentro del grupo	0.000137895	18	7.66083E-06			
Total	0.000710733	23				

FUERZA DE FRACTURA.

Análisis estadístico para el Qn/ β -GF y Qn-PVA.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	0.00032487	1	0.00032487	2.289792946	0.147587655	4.413873405
Columnas	0.001019406	2	0.000509703	3.592552855	0.048658481	3.554557146
Interacción	0.000126006	2	6.30029E-05	0.444065162	0.648263859	3.554557146
Dentro del grupo	0.002553798	18	0.000141878			
Total	0.00402408	23				

ELASTICIDAD

Análisis estadístico para el Qn/ β -GF y Qn-PVA.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	1.861131968	1	1.861131968	2.077354695	0.166670446	4.413873405
Columnas	10.85560412	2	5.427802062	6.058393651	0.009731388	3.554557146
Interacción	0.002767071	2	0.001383535	0.001544272	0.998457052	3.554557146
Dentro del grupo	16.12645905	18	0.895914392			
Total	28.84596221	23				



5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmadi R, Zhou, M & Brujin JD, 2005, *The use of thermo-sensitive chitosan as an injectable carrier for bone tissue engineering*. European Cells and Materials vol. 10 suppl. 2 61.
2. Alencaster, CB & Ramírez, OME 1998, '*Evaluación de la textura de materiales con máquina universal de deformación*', Curso de superación académica. Departamento de ingeniería y tecnología, sección LEM alimentos.
3. Baduí, DS 2006 '*Química de los alimentos*' 4^{ta}. Edición Pearson Education, Edo. De México pp.75-557.
4. Barrangou L, Drake MA, Daubert, CR, & Foegeding EA, 2006. *Textural properties of agarose gels. II. Relationships between rheological properties and sensory texture*. Food Hydrocolloids vol. 20 pp. 196–203.
5. Berger, J, Reist, M, Mayer, JM, Felt O & Gurny, R 2004, *Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications*. European Journal of Pharmaceutics and biopharmaceutics. Vol.57 pp 35-52.
6. Berger, J, Reist M, Mayer, JM, Felt O, Peppas, NA & Gurny, R 2003, *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. Vol.57 pp. 19-34.
7. Cano, SE & Urbina, FM 2008, *Polímeros inteligentes, informe de vigilancia tecnológica*. CIMTAN Universidad Carlos III de Madrid.
8. Carhuapoma, BW & Santiago, JC, 2005, *Caracterización de hidrogeles de quitosano-alcohol polivinílico obtenidos por radiación gamma*. Revista Iberoamericana de Polímeros. Volumen 6 (4), pp. 333-346.



9. Chandroth, KS & Tholath, EA, 2010, *Transparent xyloglucan–chitosan complex hydrogels for different applications*. Food Hydrocolloids, vol. 24, pp. 72–80
10. Chenite, M, Buschmann, D, Wang, C, Chaput, N & Kandani, 2001, *Rheological characterization of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions*. Carbohydrate Polymers. Vol. 46, pp. 39-47.
11. Chenite, A, Chaput, C, Wang, D, Combes, C, Bushmann, MD, Hoemann, CD, Leroux, JC, Atkinson, BL, Binette, F, & Selmani, A, 2000, *Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ*. Biomaterials Vol.21, pp. 2155-2161
12. Crompton, KE, Prankerd, RJ, Paganin DM, Scott, TF, Horne, MK & Finkelstein, DI, 2005, *Morphology and gelation of thermosensitive chitosan hydrogels*. Biophysical Chemistry Vol. 117, pp. 47-53.
13. Echeverri, CE, Vallejo, C, & Londoño, ME, 2009, *Síntesis y caracterización de hidrogeles de alcohol polivinílico por la técnica de congelamiento/descongelamiento para aplicaciones médicas*. Revista EIA, ISSN 1794-1237 Número 12, p. 59-66.
14. Fennema, OR, 1993 'Química de los alimentos'. ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España, pp.124-129.
15. Fernández, MA, 1998, *Hidrólisis enzimática de carboximetilquitosana y carboximetilquitosana*. Rev. Cubana Farm. Universidad de la Habana. Facultad de Farmacia y Alimentos. La habana, Cuba. Vol. (32) 2, pp.125-129.
16. Foegeding, EA, 2007, *Rheology and sensory texture of biopolymer gels*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, Vol. 12, pp.242–250.
17. Ganji, F, Abdekhodaie, & Ramazani, 2007, *Gelation time and degradation rate of chitosan-based injectable hydrogel*. S.A.A.J. Sol-Gel Sci Techn, Vol. 42, pp. 47-53.



18. Gonzales, GS, Ruiz, VR & Hernández, BEM, 2003, '*Guía de microscopia electrónica*' UNAM, FESC 1ª. Edición Octubre México.
19. González, BFJ, 2008, *Prácticas de calorimetría diferencial*. Open Course Ware, Universidad Carlos III de Madrid.
20. González, SJ, & Álvarez, VA, 2009, *Hidrogel de polivinil alcohol para liberación controlada de drogas*. Instituto de Investigaciones en ciencia y Tecnología de materiales INTEMA (CONICET-UNMdP).
21. Hatakeyama, T & Quinn FX '*Thermal analysis Fundamentals and Applications to Polymer Science*' 2da. Edition. Editorial Wiley. P.p 11-43.
22. Hiemenz, Paul, Lodge, Timothy, 2007, *Polymer Chemistry*. 2da. Edition. Boca Raton Florida, USA, pp. 474- 495.
23. Jarry, C, Leroux, JC, Haeck, J & Chaput, C, 2002, *Irradiation or Autoclaving Chitosan/Polyol Solutions: Effect on thermogelling chitosan- β -glycerophosphate Systems*. Chem. Pharm. Bull. Vol. 50 (10) 1335-1340.
24. Jeong, B, Sun Wang, K & You Han B, 2002, *International sol-gel reversible hydrogels*. Advanced drug Delivery Reviews. Vol. 54 pp. 37-51.
25. Jian Ping Gong, Go Kagata & Yodhiito Osada, 2000, *Intelligent Gel. Surface Properties and Functions of Gel*. Macromol Symp. Vol. pp. 159, 215-220
26. Kempe, S, Metz H, Bastrop, M, Hvilsom, A, Contri, RV & Mäder, K, 2008, *Characterization of thermosensitive chitosan-based hydrogels by rheology and electron paramagnetic resonance spectroscopy*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Vol.68 pp.26–33.



27. Koyano, T, Koshizaki, N, Umehara, H, Nagura, M & Minoura, N, 2000, *Surface states of PVA/chitosan blended hydrogels*. Polymer, Vol. 41 pp. 4461-4465.
28. Lárez, VC, 2006, *Quitina y quitosano: materiales del pasado y el futuro*. Avances de Química. Vol.1 (2), pp.15-21
29. Lau, MH, Tang, J & Paulson, AT, 2000, *Texture profile and turbidity of gellan/gelatin mixed gels*. Food Research International. Vol. 33 pp. 665-671.
30. Lewandowska, K, 2009, *Miscibility and thermal stability of poly (vinil alcohol)/chitosan mixtures*. Termochimica Acta Vol. 493, pp. 42-48.
31. Martien, FL, 1986, *Encyclopedia of polymer sciences and engineer*. New York: Wiley pp 17, 167.
32. Martínez-Ruvalcaba, A, Chornet, E & Rodrigue, D, 2007, *Viscoelastic properties of dispersed chitosan/xanthan hydrogels*. Carbohydrate Polymers, Vol. 67, pp. 586–595.
33. Minoura, N, Koyano, T, Koshizaki, N, Umehara, H, Nagura, M & Kobayashi, K, 1998, *Preparation, properties, and cell attachment/growth behavior of PVA/ chitosan-blend hydrogels*. Materials Science and Engineering, Vol. C6 pp. 275-280.
34. Monopoli, DV, Pizzio, RL & Blanco, NM, *Preparación y caracterización de ácido tungstofosfórico inmovilizado en soportes no tradicionales*. Universidad Nacional de la Plata, CINDECA.
35. Morales, ZJ & Salazar, RA, 2001, *'Estimación del efecto anti fúngico de una película de quitosán sobre los parámetros de calidad y grado de madurez de la fresa fragaria vesca variedad solana durante su vida útil'* Tesis I.A. UNAM, FESC, pp. 45-51.
36. Paradossi, G, Lisi, R, Paci, M, & Cresenzi, V, 1996, *New Chemical hydrogels based on poly (vinil alcohol)*. Journal of polymer Science Vol. 34, pp. 3417- 3425.



37. Pastor de Abram Ana *et al.* 2004, '*Quitina y quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones*' Pontificia Universidad Católica del Perú/ Fondo Editorial pp. 125-300.
38. Pérez, P, *Sistemas Poliméricos de Entrecruzamiento Biodegradable*. Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros. CSIC Universidad Complutense de Madrid. pp.1-193.
39. Rhosental, J, Andrew, & Tech B. 2001 '*Textura de alimentos, medida y percepción*' Ed. Acribia S.A., Zaragoza España, pp.
40. Rodríguez, P, San Martín, ME, & González de la Cruz G., 2001, *Calorimetría diferencial de barrido y rayos-x del almidón obtenido por nixtamalización fraccionada*. Centro Investigación en Ciencias Aplicadas y Tecnología Avanzada del I.P.N. Superficies y Vacío, Vol. 13, pp. 61-65.
41. Ruel Gariépy, E, Chenite, A, Chaput, Guirguis, S & Leroux, J-C, 2000, *Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs*. International Journal of Pharmaceutics. Vol. 203, pp.89-98.
42. Ruel Gariépy, E, Matthew, S, Bichara, A, Mohammed, B, Chenite, A, & Leroux, J-C, 2004, *A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Vol.57 pp 53-63.
43. Schnabel, W, 1981, '*Polymer Degradation, Principles and Practical Applications*' Editorial Anser International, Berlin Alemania, pp 151-171.
44. Shilan, Chena, Mingzhu, Liu, Shuping, Jin, & Bin Wang, 2008, *Preparation of ionic-crosslinked chitosan-based gel beads and effect of reaction conditions on drug release behaviors*. International Journal of Pharmaceutics Vol. 349 pp. 180–187.



45. Skoog, DA, Holler, FJ & Nieman, TA, 2001, '*Principios de análisis instrumental*' 6ª Edición, Mc Graw-Hill, Madrid, España, pp. 592-597, 900-905.
46. Sosnik, A, 2007, *Diseño de biomateriales inyectables para aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. Pasado, presente y futuro de los implantes generados in situ*. *Ars Pharm*, Vol.48 (1), pp. 83-102.
47. Spigno, G, Dante, MF, 2004, *Gelatinization kinetics of rice starch studied by non-isothermal calorimetric technique: influence of extraction method, water concentration and heating rate*. *Journal of Food Engineering*, Vol.62, pp 337-334.
48. Tang, Yu-Feng, Du Yu-Min, Hu Xian-Wen, Shi Xiao-Wen, & Kennedy, JF, 2007, *Rheological characterization of a novel thermosensitive chitosan/poly (vinyl alcohol) blend hydrogel*. *Carbohydrate polymers*, Vol. 67, pp.491-499.
49. Truong, NK & West, JL, 2002, *Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications*. *Biomaterials*, Vol. 23, pp. 4307-4314.
50. Wang, T, Thuhan, M & Guasekaran, S, 2004, *Selected properties of pH sensitive, biodegradable chitosan-poly (vinyl alcohol) hydrogel*. *Polymer International*. Vol.53, pp. 911-918.
51. Wind, HM, Budavan, S, Stromtsos, LY & Noether, FM, 1976, '*The merck index an encyclopedia of chemicals and drugs*' 9 Editions. Merck & Co. Inc. Raltway, N.J. USA.
52. Yacamón, MJ & Reyes, GJ, 1995, '*Microscopia electrónica, una visión del microcosmos*' Consejo Nacional de ciencia y Tecnología. Fondo de Cultura Económica. México D.F.
53. Yun Zhou Hui, Guang Chen Xi, Kong Ming, Sheng Liu Cheng, Su Cha Dong & Kennedy, F, 2008, *Effect of molecular weight and degree of chitosan deacetylation on the preparation and characteristics of*



chitosan thermosensitive hydrogel as a delivery system.

Carbohydrate polymers. Vol. 73 pp.265-273.

54. <http://pslc.ws/spanish/index.htm>

55. <http://bioabsorbible.info/Curiosidades/degradacionbiopolimeros.html>

56. <http://gmein.uib.es/otros/enzimas/Jmoldesarrollo/lisozimajmol/lisozimajmol.html>

57. <http://www.eis.uva.es/~macromol/curso0506/medicina/hidrogeles.htm>