



Casa abierta al tiempo

**Universidad Autónoma Metropolitana**  
*Unidad Iztapalapa*

---

**Preparación y caracterización de materiales a base de  
quitosano biológico-químico y derivados del ácido láctico**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA**

P R E S E N T A:

I.B.I. Andres Uriel Espadín Dávila

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto<sup>1</sup>

Asesores:

Dr. Miquel Gimeno Seco<sup>2</sup>

Dr. Alberto Tecante Coronel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa

<sup>2</sup>Dpto. de Alimentos y Biotecnología, UNAM.

Julio de 2012.

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamientos del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (No. de Proyecto PICTSA 11-69) y SALUD-2011-1-161687.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## ACTA DE EXAMEN DE GRADO

NÚMERO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

PREPARACION Y  
CARACTERIZACIÓN DE  
MATERIALES A BASE DE  
QUITOSANO BIOLÓGICO-QUÍMICO  
Y DERIVADOS DEL ÁCIDO LÁCTICO

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 25 del mes de julio del año 2012 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ELSA BOSQUEZ MOLINA  
DR. NEITH ARACELY PACHECO LOPEZ  
DR. ALBERTO LOPEZ LUNA  
DR. MIGUEL SIMENO SECO



ANDRÉS URIEL ESPADÍN DAVILA  
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

DR. ANDRÉS URIEL ESPADÍN DAVILA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*- APROBAR -*

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA (IASI)  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS

PRESIDENTA

*Elsa Bosquez Molina*  
DRA. ELSA BOSQUEZ MOLINA

VOCAL

*Neith Aracely Pacheco Lopez*  
DR. NEITH ARACELY PACHECO LOPEZ

VOCAL

*Alberto Lopez Luna*  
DR. ALBERTO LOPEZ LUNA

SECRETARIO

*Miguel Simeno Seco*  
DR. MIGUEL SIMENO SECO

## Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana y al CONACyT, por el financiamiento otorgado para la realización de esta tesis.

A la Dra. Keiko Shirai por su dirección, apoyo, confianza, consejos, tiempo dedicado y la infraestructura de su laboratorio.

A mis asesores Dr. Miquel Gimeno y Dr. Tecante Coronel por sus asesoramientos, paciencia y la infraestructura de sus laboratorios.

A la Dra. Neith Pacheco y la Dra. Elsa Bosquez por revisar y enriquecer este trabajo con sus comentarios.

Al Dr. Alberto López por su amistad, asesoramiento, guía, confianza, consejos, paciencia, y apoyo brindado en todo momento.

A la Dra. Cristina Velazquillo por su asesoramiento, apoyo y la infraestructura de su laboratorio.

Al Dr. Fernando Díaz de León y al Dr. Humberto Torres por los consejos e infraestructura de sus laboratorios.

A las personas del INR en especial a Nadia, Karla y Lenin por su apoyo, amistad, asesoramiento y por hacer más amena mi estancia en el instituto.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Carmen, Monse, Itzel, Lupita, Zaizy, Jimena, Ruth, Facundo, Marco y Alfonso que han hecho divertida mi estancia en el laboratorio.

A mis amigos.

A todos gracias.

## Dedicatorias

A Dios.

A ti mamá Oliva Dávila Martínez y ti papá Faustino Espadín Enríquez que con su amor y ejemplo me han enseñado día a día a luchar por lo que uno quiere y desea.

A mis hermanas Yamile y Shiadani por su paciencia, cariño y apoyo en la realización de una meta más.

A mis abuelos que son una ejemplo para mí, por demostrarme que la vejes solo está en la mente y que uno siempre puede hacer las cosas. Gracias familia los amo.

Al amor de mi vida Cecilia Colín García, eres la inspiración y la fuerza que necesitaba para realizar grandes cosas, gracias por creer en mí y darme tu apoyo incondicional, porque estando juntos el cielo es el límite. Te amo.

A mis amigos por su apoyo.

Muchas gracias a todos.

## Abreviaturas

AL	Ácido Láctico
ASTM	Sociedad Americana para Pruebas y Materiales Internacionales
ATT	Ácido Total Titulable
BL	Bacterias Lácticas
C1	Quitosano proporcionado por Juárez.
DA	Grado de Acetilación
dA	Purificación por precipitación directa
D <sub>ap</sub>	Tamaño aparente de cristal
dfA	Purificación por precipitación de solución fría en acetona
dfAf	Purificación de solución fría en acetona fría
DM	Desmineralización
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
DP	Desproteínización
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
E (%)	Porcentaje de Erosión
FAL	Fermentación Ácido Láctica
FM (%)	Porcentaje de Fracción Molar
FTIR	Espectroscopia Infrarroja de Transformación de Fourier
H (%)	Porcentaje de Hinchamiento
<sup>1</sup> H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
I <sub>CR</sub>	Índice de cristalinidad
L1	Quitosano proveniente del primer lote de quitina
L2	Quitosano proveniente del segundo lote de quitina
L3	Quitosano proveniente del tercer lote de quitina
MEB	Microscopia Electrónica de Barrido
M <sub>v</sub>	Peso molecular por Viscosidad
M <sub>w</sub>	Peso molecular por Viscosidad
PAA	Polimerización por apertura de anillo
PBS	Solución salina de búfer de fosfatos
PDLLA	Poli D,L Ácido Láctico
PLA	Poli Ácido Láctico
PLLA	Poli L- Ácido Láctico
QAL	Quitosano- g- Ácido Láctico
QPAL	Quitosano-g- Poli Ácido Láctico
QPLA	Quitosano-g-Poliláctido
RM	Relación Molar
TG	Análisis termogravimétrico
T <sub>g</sub>	Temperatura de transición vítrea
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusión

# Contenido

Agradecimientos.....	iv
Dedicatorias.....	v
Abreviaturas .....	vi
Lista de figuras .....	x
Lista de tablas.....	xii
Resumen .....	xiii
Abstract .....	xiv
1. Introducción .....	1
1.1 Biomateriales .....	1
1.2 Polisacáridos .....	2
1.3 Quitina y quitosano .....	2
1.3.1 Fuentes de quitina y quitosano .....	3
1.3.2 Propiedades .....	3
1.3.3 Obtención de quitina.....	9
1.3.4 Obtención de quitosano.....	10
1.3.5 Copolimerización .....	11
1.3.6 Aplicaciones .....	13
1.4 Poli (ácido láctico) (PLA).....	15
1.4.1 Definición.....	15
1.4.2 Precursores de PLA.....	16
1.4.3 Síntesis de PLA.....	17
1.4.4 Propiedades .....	19
1.4.5 Copolímeros de PLA.....	21
1.4.6 Aplicaciones .....	22
Antecedentes.....	24
Justificación .....	26
Hipótesis.....	27
Objetivos.....	27
General.....	27
Particulares.....	27

6. Materiales y Métodos.....	28
1a Etapa- Obtención de quitina y quitosano.....	28
6.1 Elaboración de quitosano.....	28
6.1.1 Obtención de quitina cruda .....	28
6.1.2 Obtención de quitina pura.....	28
6.1.3 Desacetilación de la quitina pura (obtención de quitosano) .....	29
6.2 Caracterización de los materiales .....	29
6.2.1 Determinación de pH y ácido total titulable (ATT) .....	29
6.2.2 Análisis químico proximal .....	29
6.2.3 Caracterización de quitosanos.....	30
2a Etapa – Síntesis y caracterización de materiales .....	30
6.3 Síntesis de los materiales (segunda etapa).....	31
6.3.1 Síntesis de quitosano-g-ácido láctico por policondensación (QAL).....	31
6.3.2 Síntesis de quitosano-g-Poli (ácido láctico) por policondensación (QPAL). .....	31
6.3.3 Síntesis de quitosano-g-Poli (láctido) por polimerización por apertura de anillo (PAA) (QPLA).....	32
6.3.4 Síntesis de los copolímeros QAL, QPAL y QPLA con el quitosano L3. ....	32
6.4 Caracterización de los copolímeros. ....	33
6.4.1 Determinación de rendimientos .....	33
6.4.2 Porcentaje de incorporación .....	33
6.4.3 Solubles y peso molecular del copolímero.....	33
6.4.4 Espectroscopia de ATR-FTIR .....	33
6.4.5 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( <sup>1</sup> H-RMN) .....	34
6.4.6 Estabilidad térmica. ....	34
6.4.7 Rayos X.....	34
6.4.8 Determinación de las propiedades mecánicas de esfuerzo-deformación.....	35
6.4.9 Pruebas fisicoquímicas.....	36
3a Etapa - Pruebas biológicas .....	37
6.5 Pruebas biológicas.....	37
6.5.1 Prueba de adhesión celular y viabilidad.....	37
6.5.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana .....	38
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
7.1 Obtención de quitosano y caracterización.....	39



7.1.1 Fermentación ácido láctica .....	39
7.1.2 Análisis químico proximal .....	40
7.1.3 Caracterización de quitosanos.....	41
7.2 Síntesis y caracterización de los copolímeros.....	42
7.2.1 Síntesis de quitosano-g-ácido láctico (QAL). .....	42
7.2.2 Síntesis de quitosano-g-poli (ácido láctico) (QPAL). .....	46
7.2.3 Síntesis de quitosano – poli (Láctido) (QPLA).....	48
7.2.4 Síntesis de los copolímeros QAL, QPAL Y QPLA pero con el quitosano L3. ....	49
7.2.5 Peso molecular y porcentaje de solubles en ácido 0.1M.....	51
7.2.6 Análisis de IR de los copolímeros. ....	52
7.2.7 Análisis de <sup>1</sup> H-RMN de los copolímeros. ....	57
7.2.8 Análisis de estabilidad térmica.....	60
7.2.9 Análisis de rayos X .....	63
7.2.10 Pruebas mecánicas .....	65
7.2.11 Pruebas fisicoquímicas.....	69
7.3 Pruebas biológicas: viabilidad de fibroblastos humanos y actividad antimicrobiana. ....	73
7.3.1 Ensayos celulares con los polímeros del quitosano C1. ....	73
7.3.2 Ensayos celulares con los polímeros del quitosano L3. ....	78
7.3.3 Prueba de actividad antimicrobiana de los materiales. ....	83
CONCLUSIONES .....	85
Bibliografía.....	86
ANEXOS.....	98

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los polímeros biodegradables.....	1
Figura 2. Estructura primaria de la quitina y el quitosano.....	2
Figura 3. Estructuras de L-, meso- y D-láctidos. ....	17
Figura 4. Métodos de síntesis para obtener PLA de alto peso molecular .....	17
Figura 5. Evolución del pH y ATT en las muestras líquidas de la LAF para la extracción biológica de quitina. ....	39
Figura 6. Copolimerización por injerto de quitosano y ácido láctico. ....	42
Figura 7. Copolimerización de quitosano y ácido láctico por injerto. ....	47
Figura 8. Mecanismo de reacción para la síntesis de quitosano-g-poliláctido. ....	48
Figura 9. Espectro de infrarrojo medio del quitosano nativo.....	53
Figura 10. Espectro de infrarrojo medio de ácido láctico.....	54
Figura 11. Espectro de infrarrojo de quitosano (L3), AL, QAL, QPAL y QPLA. ....	56
Figura 12. Espectro de infrarrojo medio de todos los sobrenadantes después de la extracción con acetona. ....	57
Figura 13. Espectro de RMN-1H a 400 MHz de quitosano en medio ácido de acuerdo a Hirai et al, (1991). ....	58
Figura 14. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H a 400MHz de ácido láctico en D <sub>2</sub> O de acuerdo a Qu <i>et al</i> , (1999). ....	58
Figura 15. Espectro de RMN-1H a 400MHz de QAL en medio ácido.....	59
Figura 16. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H a 400MHz de QPAL en medio ácido. ....	59
Figura 17. Espectro de RMN-1H a 400MHz de QPLA en medio ácido.....	60
Figura 18. Termogramas de quitosano (C1), QAL, QPAL y QPLA del primer lote.....	60
Figura 19. Termogramas de quitosano (L3), QAL, QPAL y QPLA del segundo lote.....	61
Figura 20. Análisis de DSC del quitosano (QUIT), QAL, QPAL Y QPLA de los materiales del quitosano L3. ....	62
Figura 21. Perfil de difracción de rayos X del quitosano (C1), QAL, QPAL y QPLA. ....	63
Figura 22. Perfil de difracción de rayos X de quitosano (L3), QAL, QPAL y QPLA.....	64
Figura 23. Ejemplo de diagrama de esfuerzo-deformación unitario para un material (Fitzgerald, 1990). ....	66
Figura 24. Perfiles de esfuerzo-deformación de extensión de QAL, QPAL y QPLA. ....	67
Figura 25. Perfil de esfuerzo-deformación de punción para QAL, QPAL y QPLA.....	68
Figura 26. Perfil de hinchamiento de los copolímeros del quitosano C1 a través del tiempo. ....	69

Figura 27. Perfil de hinchamiento de los copolímeros del quitosano L3 a través del tiempo.	70
Figura 28. Cinética de degradación en medio DMEM de QAL, QPAL y QPLA preparados a partir del quitosano C1.	71
Figura 29. Cinética de degradación en medio DMEM de QAL, QPAL y QPLA preparados a partir del quitosano L3.	72
Figura 30. Micrografías de luz visibles de los copolímeros del quitosano C1 del cuarto ensayo.	76
Figura 31. Micrografías de fluorescencia de la prueba de calceína de los polímeros de quitosano C1 de cuarto ensayo.	77
Figura 32. Prueba de calceína para los polímeros QAL, QPAL y QPLA del quitosano L3, del segundo ensayo.	79
Figura 33. Prueba de calceína para QAL y QAL+S del quitosano L3 del tercer ensayo celular.	81
Figura 34. Prueba de viabilidad de QAL y QAL+S del quitosano L3 del cuarto ensayo.	82
Figura 35. Efecto de inhibición de los materiales a base de quitosano L3.	84

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Copolímeros de quitosano métodos de obtención, presentaciones y aplicaciones.....	12
Tabla 2. Análisis químico proximal de los materiales, involucrados en la obtención de quitosano. .....	40
Tabla 3. Peso molecular ( $M_v$ ), grado de acetilación (DA) y porciento de solubles de los quitosanos en ácido acético (0.1 M). .....	41
Tabla 4. Rendimientos y porcentajes de incorporación obtenidos de cada una de los métodos de purificación.....	43
Tabla 5. Relación molar y porciento de fracción molar del copolímero quitosano-g-ácido láctico determinado por $^1\text{H-RMN}$ . .....	44
Tabla 6. Porcentajes de incorporación a diferentes tiempos de reacción de policondensación de ácido láctico en quitosano. ....	45
Tabla 7. Incorporación de AL con quitosanos con diferentes %DA mediante la reacción de policondensación.....	46
Tabla 8. Rendimientos y porcentajes de incorporación de AL en quitosano mediante la reacción de policondensación con catalizador. ....	47
Tabla 9. Relación molar y porciento de fracción molar del copolímero quitosano-g-poliláctico. ...	48
Tabla 10. Rendimientos y porcentajes de incorporación de AL en quitosano mediante la reacción de polimerización por apertura de anillo. ....	49
Tabla 11. Relación molar y porciento de fracción molar del copolímero quitosano-g-poliláctido. .	49
Tabla 12. Rendimientos y porcentajes de incorporación de AL en los Quitosanos C1 y L3, en los diferentes copolímeros. ....	50
Tabla 13. Relación molar y porciento de fracción molar de los copolímeros determinador por $^1\text{H-RMN}$ . .....	51
Tabla 14. Peso molecular y porciento de solubles de los dos lotes de materiales en ácido acético (0.1 M). ....	52
Tabla 15. Bandas características de los grupos funcionales del espectro de quitosano.....	54
Tabla 16. Índice de cristalinidad ( $I_{CR}$ ) y tamaño aparente del cristal ( $D_{ap}$ ) de los quitosanos nativos y de los copolímeros.....	65
Tabla 17. Propiedades mecánicas obtenidas de la fuerza de ruptura a la extensión para QAL, QPAL y QPLA.....	68
Tabla 18. Propiedades mecánicas obtenidas de la fuerza de ruptura a la punción para QAL, QPAL y QPLA.....	68
Tabla 19. Porcentaje de hinchamiento en medio DMEM a 36.5 °C de QAL, QPAL y QPLA preparados con de los quitosanos C1 y L3.....	70
Tabla 20. Ángulo de contacto para los copolímeros QAL, QPAL y QPLA sintetizados a partir del quitosano L3. ....	73

## Resumen

Se preparó quitosano químico-biológico conservando su estructura cristalina y con las propiedades para ser utilizado en ingeniería de tejidos, con el cual se elaboraron tres copolímeros por injerto con derivados de ácido láctico.

Se preparó Quitosano-g-ácido láctico (QAL) por injerto directo en los grupos aminos del quitosano sin catalizador, también se elaboró quitosano-g-poli (ácido láctico) (QPAL) con un método directo de injerto como en el material anterior pero con ayuda de un catalizador y finalmente por medio de una polimerización por apertura de anillo (PAA), se sintetizó quitosano-g-poli(láctido) (QPLA).

Las estructuras de los copolímeros fueron caracterizados por FTIR, <sup>1</sup>H-RMN, Rayos X y termogravimetría (TG y DSC). El porcentaje de incorporación fue determinado en peso y mediante relación de áreas de bandas de prueba y referencia de los espectros FTIR. Las relaciones molares y porcentuales de fracción molar se determinaron mediante la relación de áreas de <sup>1</sup>H-RMN de los picos característicos del ácido láctico y del quitosano.

Asimismo, se les determinó su peso molecular por viscosidad, porcentaje de solubles en ácido acético 0.1M, su resistencia a la extensión y a la punción, así como su capacidad de hinchamiento y porcentaje de degradación en el medio de cultivo a utilizar en los ensayos *in vitro* con los fibroblastos.

Se realizaron los cultivos de fibroblastos para determinar su citocompatibilidad evaluando la adhesión y viabilidad celular sobre los copolímeros, así como ensayos de inhibición de crecimiento de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 2783).

Los resultados mostraron que el copolímero con el menor grado de injerto (20.22%), QAL, presento células vivas y adheridas conservando su actividad antimicrobiana; mientras que los compuestos QPLA y QPAL no mostraron adhesión celular pero sí inhibición microbiana y resistencia a la tensión y punción. QAL y QPAL conservaron la cristalinidad ( $I_{CR}$  61.4%), por lo que fueron más termoestables, mientras que QPAL fue más amorfo presentando menor estabilidad térmica a los materiales mencionados.

## Abstract

Chitosan was obtained by a chemical-biological method preserving their crystalline structure and properties for use in tissue engineering, three materials were prepared with the chitosan and lactic acid derivatives by grafting.

Chitosan-g-lactic acid (QAL) was prepared by direct grafting amino groups of chitosan without catalyst, chitosan-g-poly (lactic acid) (QPAL) was elaborated with a method of direct crosslinking as the previous one but adding a catalyst and chitosan-g-poly (lactide) (QPLA) was synthesized by ring opening polymerization (ROP) method.

The structures of the graft copolymers were characterized by FTIR, <sup>1</sup>H-NMR, X-ray diffraction and thermogravimetry (TG and DSC). The incorporation rate was determined by weight and in an area ratio of FTIR, reaction molar percent and mole fraction ratio was determined by integration of characteristic signals in <sup>1</sup>H-NMR spectra.

Materials were also characterized by viscosity molecular weight, solubility percentage in 0.1M acetic acid, its tensile strength and puncture resistance and its swelling capacity and rate of degradation.

Fibroblast culture was performed to determine adhesion and cell viability over the copolymers and an inhibition test of the strain *P. aeruginosa* (ATCC 2783).

The results showed that the copolymer with the lower degree of grafting, QAL, presents adherent living cells and preserves antimicrobial activity, while compounds QPAL QPLA showed no cell adhesion but microbial inhibition and good mechanical properties. QAL and QPAL preserved the crystallinity ( $I_{CR}$  61.4%) therefore they were more thermostable, while QPAL was more amorphous but displayed a pseudo-crystalline arrangement although lower thermal stability to the aforementioned materials.

# 1. Introducción

## 1.1 Biomateriales

El campo de los biomateriales ha experimentado un espectacular avance en los últimos años, como consecuencia del aumento de la expectativa de vida del ser humano, debido a las enormes posibilidades que ofrecen, tanto en variedad de compuestos, como en procesos de fabricación con características bien definidas y con el propósito de tener una aplicación en el campo de las ciencias de la vida y de la salud (Valdez *et al*, 2005; Vallerti & Cormas, 2007).

Los biomateriales son sustancias de origen natural o sintético que pueden interactuar con los sistemas biológicos de manera temporal o permanente. Estos ofrecen una alternativa para tratar y reparar la pérdida de tejidos u órganos de un trauma o enfermedad. Hay muchas aplicaciones biomédicas en las cuales los biomateriales se han utilizado, por ejemplo, como un sistema de administración de fármacos, andamiaje celular, sutura en ingeniería de tejidos; como prótesis para reemplazo de tejidos como la lente intraocular, implante dental y los implantes de mama, así como también en órganos artificiales para asistencia temporal o permanente (por ejemplo, riñón artificial, corazón artificial e injerto vascular) (Cheng *et al*, 2009).

Entre la gran variedad de materiales que se han utilizado para la atención médica, se incluyen los metales, cerámicas y polímeros. Los polímeros biodegradables y bioabsorbibles tienen excelentes características para ciertas aplicaciones. Los polímeros reabsorbibles se disuelven de forma gradual y se eliminan a través de los riñones u otros medios. La figura 1 se muestra una clasificación de los polímeros biodegradables.

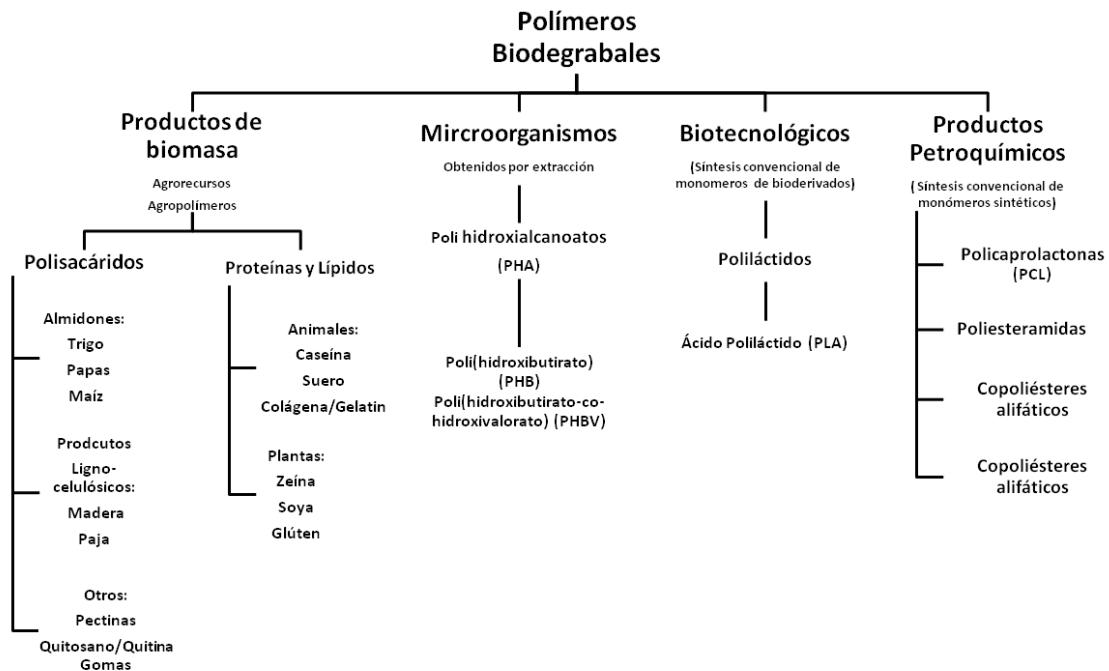


Figura 1. Clasificación de los polímeros biodegradables (Avérous, 2004).

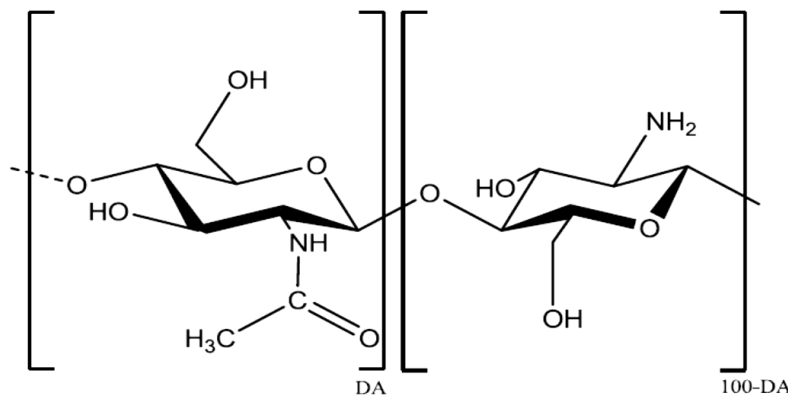
Entre los principales polímeros utilizados en la medicina están los polisacáridos y los poli  $\alpha$ -hidroxi ácidos, debido a que son biocompatibles, biodegradabilidad, además de que son bioreabsorbibles.

## 1.2 Polisacáridos

Un gran número de polisacáridos con diferentes estructuras químicas y propiedades físicas constituyen una fuente importante de materiales, para en el futuro ampliar sus aplicaciones y mejorar las aplicaciones existentes, especialmente en el ámbito de los biomateriales para la cicatrización de heridas, la ingeniería de tejidos, liberación controlada o vehículo de fármacos, entre otras (Dumitriu, 2002; Rinaudo, 2006a). Su desarrollo abre un gran campo de aplicaciones aprovechando sus propiedades específicas particularmente, por ser renovables, biodegradables y algunos de ellos con actividad biológica (Rinaudo, 2006b; Rinaudo, 1993). Generalmente estos son obtenidos por biosíntesis en las plantas (incluidas las algas) o en los animales; algunos polisacáridos microbianos tales como el ácido hialurónico bacteriano (HA), gellana o xantana (Rinaudo *et al*, 2004; Rinaudo, 2006c; Geremia & Rinaudo, 2005). Algunos de estos polisacáridos son considerados como buenos candidatos para aplicaciones biomédicas, principalmente el quitosano, los alginatos y el HA. Y también han sido reconocidos por su actividad biológica como es el caso del quitosano y el HA (Rinaudo, 2006d; Rinaudo, 2007; Milas & Rinaudo, 2005).

## 1.3 Quitina y quitosano

La quitina (poli- $\beta$ -(1-4)-*N*-acetil-*D*-Glucosamina) es ampliamente sintetizada en un buen número de organismos vivos, es el segundo polímero más abundante de la naturaleza (Rinaudo, 2006d). Su principal derivado es el quitosano, poli ((1-4)2-amino-2-desoxi- $\beta$ -*D*-glucosa) (Rabea *et al*, 2003), este es el componente principal de los organismos vivos tales como los hongos (Figura 2).



**Figura 2.** Estructura primaria de la quitina y el quitosano.

En su forma natural la quitina se presenta parcialmente desacetilada aunque la diferencia entre ésta y el quitosano es arbitraria, ya que las formas totalmente acetiladas o desacetiladas no existen en la naturaleza, ni como productos finales en un proceso, por lo



que en la práctica, al polímero que presenta mayor acetilación se le denomina quitina y al más desacetilado quitosano (Shirai *et al*, 1996). Algunos autores establecen la diferencia entre los dos biopolímeros se encuentra alrededor de un DA del 50% (Domard, 1989).

### **1.3.1 Fuentes de quitina y quitosano**

La quitina se encuentra en la naturaleza formando microfibrillas cristalinas ordenadas que se encuentran como componentes estructurales en el exoesqueleto de los artrópodos o en la pared celular de hongos filamentosos y levaduras, entre otros. La principal fuente comercial de quitina son las conchas de cangrejo y de camarones ya que se encuentran disponibles como desechos de la industria marisquera (Rinaudo, 2006d; Kurita, 2006).

#### **1.3.1.1 Quitina de crustáceos**

Los crustáceos son la mayor fuente de quitina a nivel industrial con una producción de entre 2200 Ton (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003). El contenido de quitina en crustáceos varía entre 2 y 12% del total de masa su corporal, el contenido de quitina, proteína, minerales y carotenoides en el exoesqueleto de crustáceos varía dependiendo de la especie, parte del organismo, estado de nutrición y ciclo reproductivo. El exoesqueleto contiene alrededor del 15-40% de quitina ( $\alpha$ -quitina), alrededor del 20 al 40% de proteínas y carbonato de calcio entre 20-50%, como componentes principales, y presenta en menor cantidad pigmentos y otras sales metálicas (Pacheco, 2010). La quitina se encuentra en la naturaleza ligada a otros componentes estructurales como minerales, proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos, éstos últimos para formar paredes celulares en los hongos (Rinaudo, 2006d).

#### **1.3.1.2 Quitina de hongos**

Diferentes hongos como *Allomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Choanephora*, *Tamnidum*, *Zygorrynchus* y *Phycomicetos* presentan en su pared celular quitina, presentando otra fuente de materia prima, además de que pueden ser extraídos de los residuos de la biomasa en la producción de enzimas, vitaminas antibióticos hormonas y otros productos farmacéuticos (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003). La quitina es un biopolímero que puede tener muchas aplicaciones en el mercado, por lo que se ha promovido su explotación a través de procesos que la hagan económicamente viable. La compañía Kyowa Yushi Inc., de Chiba, Japón, fue la primera en producir quitosano a nivel industrial (Shirai *et al*, 1996).

### **1.3.2 Propiedades**

El quitosano es conocido por ser no tóxico, inodoro y biocompatible con los tejidos animales, así como biodegradable (Teng *et al*, 2001) por estas propiedades va en aumento su uso en la biomedicina, farmacéutica y en productos médicos de ingeniería tisular (TEMPs). El conocimiento de las propiedades físicas y químicas del quitosano ayudarán a determinar la funcionalidad de éstos en una aplicación y a la correcta elección para sus aplicaciones particulares.

Por ello, la sociedad americana para ensayos y materiales (ASTM) está haciendo un esfuerzo concertado para establecer los estándares y lineamientos para la seguridad de quitosano en biomedicina, aplicaciones farmacéuticas y en TEMP's.

En donde es importante determinar parámetros críticos, tales como: grado de desacetilación, peso molecular y viscosidad, que tiene alta influencia en los efectos biológicos funcionales; así como el contenido de materia seca, metales pesados, carga microbiana, endotoxinas y proteínas que son descritos en los documentos de ASTM, con el fin de garantizar la uniformidad y correcto funcionamiento en el producto final (Dormish & Kaplan, 2004; F2602-08e1., 2008).

### **1.3.2.1 Propiedades físicas: Estructura cristalina**

La presencia y abundancia de los grupos hidroxilos (primario en C-6 y secundario en C-3) y el grupo *N*-acetilo o amino (en C-2) en las moléculas de quitina y quitosano respectivamente, tienen tendencia a la formación de puentes de hidrógeno intra e inter moleculares que favorecen la formación de agregados lineales de alta cristalinidad (Prashanth & Tharanathan, 2007). Las cadenas de quitina forman puentes de hidrógeno mediante los grupos C=O y H-N, que a su vez forman puentes de hidrógeno con los anillos de azúcar vecinos entre el grupo carbonilo y el grupo hidroxilo del C-6, existe otro puente de hidrógeno que se forma entre el grupo OH del C-3 y el oxígeno del anillo, lo que aumenta la rigidez de la cadena manteniendo una estructura altamente ordenada (Minke & Blackwell, 1978).

En la naturaleza hay tres formas polimorfas de quitina,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -quitina, la diferencia entre ellas se encuentra en la disposición de las cadenas. La  $\alpha$ -quitina se presenta en disposición anti paralela permitiendo la mayor cantidad de formación de puentes de hidrógeno intermoleculares, que son los responsables de su insolubilidad en disolventes acuosos y en la mayoría de disolventes orgánicos (Blackwell & Weih, 1980). En la  $\beta$ -quitina las cadenas se encuentran en forma paralela proporcionando una fuerza intermolecular más débil, permitiendo la hidratación de la molécula. Y la  $\gamma$ -quitina presenta dos cadenas paralelas en el mismo sentido y la siguiente en el sentido opuesto, esta alomorfa ha sido la menos estudiada y se puede considerar como una mezcla de las dos primeras.

La  $\alpha$ -quitina es la más abundante y estable, mientras que las otras dos se presentan en pequeñas cantidades y tienen la tendencia a ser transformadas en  $\alpha$ -quitina (Hirano, 1999; Pastor, 2004).

Contrario a la quitina, el quitosano presenta diferentes alomorfias que dependen del modo de preparación de la muestra así como de su grado de acetilación y de depolimerización. Debido a la presencia de los grupos acetamidos en el C-2 se reduce la cantidad de puentes de hidrógeno, y como consecuencia la estructura se vuelve más inestable. Las alomorfias hidratada y anhídrida del quitosano, han sido las más estudiadas (Domard, 1989).

### 1.3.2.2 Propiedades Fisicoquímicas

#### 1.3.2.2.1 Peso molecular ( $M_w$ )

Esta propiedad determina propiedades características tales como la viscosidad de las soluciones de quitosano. Por lo que en función de la sensibilidad de un uso final especial, la determinación de la masa molecular directa o indirectamente, puede ser necesaria. Los quitosanos comerciales son polidispersos con respecto al peso molecular ( $M_w$ ). El peso molecular puede ser expresado como el número promedio ( $M_N$ ) o el peso promedio ( $M_w$ ) (F2103-01, 2008).

El  $M_w$  de la quitina natural es mayor a  $1000 \times 10^3 \text{g.mol}^{-1}$ , y el del quitosano comercial se encuentra entre  $100$  y  $500 \times 10^3 \text{g.mol}^{-1}$  dependiendo de la quitina de origen. Distintos factores durante la extracción de la quitina y la preparación del quitosano pueden influir en el  $M_w$  del biopolímero final. Altas temperaturas y concentraciones de ácidos y álcalis así como largos tiempos de reacción, pueden degradar y ocasionar la despolimerización de las cadenas (Shahidi & Abuzaytoun, 2005). Diferentes autores han observado que el  $M_w$  del quitosano tiene una influencia en su actividad biológica (Rabea *et al*, 2003; Shahidi *et al*, 1999).

**1.3.2.2.1.1 Polidispersidad (PDI):** Dependiendo del uso final y la sensibilidad de la aplicación al peso molecular, la presencia de una amplia gama de fracciones de quitosano puede ser un problema, por ejemplo, en sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. En tales casos, el cálculo de la PDI puede ser importante. El coeficiente de  $M_w/M_N$  se conoce como el índice de PDI y por lo general está en el intervalo de 1.5 a 3.0 para quitosanos comerciales (F2602-08e1., 2008).

#### 1.3.2.2.2 Grado de acetilación (DA)

Los grupos aminos de la quitina nativa se encuentran en forma acetilada, los cuales pueden estar unidos a cadenas proteicas o como aminos libres, no obstante durante los procesos comunes de extracción con ácidos y álcalis se produce una inevitable desacetilación. En general los grados de acetilación de la  $\alpha$ -quitina extraída se encuentran entre 90 y 95% (Kurita, 2006).

Para preparar una quitina con estructura uniforme (poli *N*-acetil-glucosamina) se requiere una acetilación selectiva de quitina soluble o  $\beta$ -quitina (Kurita *et al*, 1977). En el quitosano el contenido de grupos *N*-acetil y la repartición de los residuos a lo largo de la cadena también dependen de las condiciones de desacetilación y las fuentes de la quitina de origen (Kurita, 2006).

El DA es uno de los factores más importantes que influyen en las propiedades de este biopolímero debido al rol que juega en la solubilidad. Al incrementar el DA del quitosano acercándose al límite de 50%, el intervalo de pH en el que puede ser soluble aumenta, lo cual se debe a la variación del pKa ocasionado por las propiedades de polielectrólito del mismo (Domard, 1989; Dormish & Kaplan, 2004). Además, el DA es un parámetro de

caracterización importante, ya que la densidad de carga de la molécula de quitosano es responsable de potencial biológico y efectos funcionales (F2260-03, 2008).

#### **1.3.2.2.1 Solubilidad**

La quitina es insoluble en agua y en la mayoría de los disolventes. Para llevar a cabo su disolución es necesario emplear disolventes que induzcan las repulsiones entre las cadenas o desequilibren los puentes de hidrógeno intermoleculares presentes en el estado sólido. Los disolventes que pueden cumplir con este propósito son la hexafluoroacetona y la N,N-dimetilacetamida (DMAc) conteniendo 5-8% LiCl (Rutherford & Austin, 1978). Recientemente, el metanol saturado con el cloruro de calcio dihidratado ha sido reportado como disolvente de la quitina utilizado anteriormente como disolvente para nylon (Tamura *et al*, 2004).

El quitosano es insoluble en disolventes orgánicos puros, pero es soluble en medio ácido acuoso (pH<6). La solubilidad se produce por la protonación del grupo amino en la posición C<sub>2</sub> de la unidad de repetición D-Glucosamina. Entonces, este polisacárido se convierte en un polielectrólito en condiciones ácidas, lo que favorece su solubilidad debido a repulsiones electrostáticas; es el único polímero catiónico pseudonatural (Muzzarelli, 1973).

La solubilidad es un parámetro muy difícil de controlar, se relaciona con el DA, la concentración iónica, el pH, la naturaleza del ácido utilizado para la protonación y la distribución de los grupos acetilo a lo largo de la cadena, así como con las condiciones para su aislamiento y secado (Muzzarelli, 1973).

#### **1.3.2.2.3 Características de control y uso final.**

**1.3.2.2.3.1 Viscosidad:** La viscosidad es la resistencia al flujo de un líquido. La masa molecular de un quitosano será determinada en la medida en que se espese una solución acuosa. El viscosímetro utilizado debe ser calibrado con las normas de trazabilidad (ensayo D2196) (F2103-01, 2008). La medida de viscosidad dependerá de varios parámetros relacionados cómo:

(1) *Temperatura:* Es fundamental porque un aumento en la temperatura, en casi todos los casos, dar lugar a una disminución de la viscosidad. Debe ser consistente y controlada para lograr resultados reproducibles. La temperatura recomendada para medir la viscosidad puede ser 20, 25 o 37°C, o una combinación de las mismas.

(2) *Concentración de quitosano:* Para preparar las concentraciones correctas de quitosano es necesario conocer el contenido de humedad de éste.

(3) *Fuerza iónica,* la viscosidad de una solución de quitosano es muy sensible al medio ambiente iónico en el que la medición se hace. Es importante mantener el contenido iónico constante. Las mediciones de viscosidad se realizan ya sea en agua desionizada o con solución salina isotónica.

(4) *Masa molecular*: La masa molecular del quitosano es sensible a las mediciones de viscosidad (F2103-01, 2008).

**1.3.2.2.3.2 Materia seca**: La determinación del contenido de la materia seca se basa en la eliminación de agua de la muestra. Normalmente con quitosano, se utilizan técnicas gravimétricas que se adaptan de USP 24/NF19 con un horno de secado calibrado a 105°C (F2103-01, 2008).

**1.3.2.2.3.3 Contenido de ceniza**: El contenido de cenizas de una muestra describe la cantidad total de material inorgánico presente. Para aplicaciones en medicina los quitosanos deben tener un contenido de cenizas muy bajo (cenizas < 2%) (F2103-01, 2008).

**1.3.2.2.3.4 Sustancias insolubles**: El porcentaje de sustancias insolubles indican la cantidad total de impurezas insolubles (sales insolubles u otros contaminantes) en la muestra de quitosano. Si bien, el quitosano utilizado en biomedicina y TEMP's deben tener el menor contenido de sustancias insolubles como sea posible (F2103-01, 2008).

**1.3.2.2.4 Perfil de impurezas**: el termino impurezas se refiere a la presencia de sustancias y materiales extraños en los quitosano en polvo. Las mayores impurezas que causan preocupación son:

**1.3.2.2.4.1 Contenido de endotoxinas**: La contaminación por endotoxinas son difíciles de prevenir debido a que éstas están en la naturaleza son estables y son lo suficientemente pequeñas para pasar a través de los filtros de esterilización. Hay pruebas rigurosas para la determinación de endotoxinas en los quitosanos o sus derivados. Éstas son la de coágulo de gel, el ensayo de punto final y el ensayo cinético, siendo este último el más eficaz. La Food and Drug Administration (FDA) define actualmente como un coeficiente de correlación lineal de  $\geq 0.980$ , en un ensayo cinético para la determinación de toxinas. El nivel de endotoxinas en quitosano en última instancia, será fundamental para su uso en aplicaciones biomédicas, donde existen los límites reglamentarios de la cantidad de endotoxina que pueden ser implantados en seres humanos. Pertinentemente la FDA establece las normas para los niveles permitidos y la información respecto a la validación de los ensayos de endotoxinas que deben ser consultados si se realizaran los ensayos en humanos (DHHS FDA, 15 de julio 1991; F2103-01, 2008).

**1.3.2.2.4.2 Contenido de proteína**: El contenido de proteína en quitosano o sales de quitosano deben ser analizadas con un método apropiado y que tenga la sensibilidad suficiente para detectar niveles bajos de contaminación. Es importante confirmar que el método elegido es insensible a otros elementos presentes en la muestra y validarlo contra un método de referencia en un solo tiempo. Es la responsabilidad del usuario final evaluar el producto de quitosano para determinar la presencia de proteínas específicas que podrían causar reacciones indeseables en los tejidos (F2103-01, 2008).

**1.3.2.2.4.3 Contenido metales pesados**: El contenido de impurezas por metales pesados no debe superar un límite en las especificaciones individuales del producto en términos de partes por millón de plomo en la sustancia de prueba. En las condiciones de

prueba especificadas, el límite se determina por una comparación visual entre metales que están coloreados y un control preparado a partir de una solución patrón de plomo. Este método se basa en (231) metales pesados, USP24/NF19. La presencia de determinados metales pesados puede ser detectada por métodos como la espectroscopía de absorción atómica utilizando técnicas de horno o llama de grafito, o por técnicas de plasma de acoplamiento inductivo (F2103-01, 2008).

**1.3.2.2.4.3 Carga microbiana:** Las bacterias, levaduras y mohos son también las impurezas que pueden surgir en una muestra de quitosano. La presencia de bacterias también puede contribuir a la presencia de endotoxinas. Los siguientes exámenes microbiológicos en la USP 24 son de particular relevancia: Prueba de límite microbiano, Prueba de esterilidad, la esterilización y la garantía de esterilidad de los artículos en compendio con las pruebas biológicas y ensayos: Pruebas bacterianas de endotoxinas. El usuario también debe considerar otras normas pertinentes, tales como: la Asociación del Avance de la Instrumentación Médica (AAMI) estándares y normas internacionales, de los cuales los siguientes son ejemplos: ANSI / AAMI / ISO 11737-1: 1995, ANSI/AAMI/ISO 11737-2: 1998, y la norma ISO 13408-1: 1998. Si los productos de quitosano están destinados a servir como una barrera a los microorganismos, esta función tendrá que ser validada con experimentos específicos (F2103-01, 2008).

### **1.3.2.3 Propiedades biológicas**

Su bioactividad incluye la estimulación en procesos de cicatrización, actividad hemostática, actividad inmune, mucoadhesión, actividad antimicrobiana, bacteriostática y fungistática. Los oligómeros de quitina y quitosano presentan funciones fisiológicas como la inducción de fitoalexinas, actividad antimicrobiana y actividad inmune, ya que algunos son solubles en agua y fácilmente pueden ser inyectados intravenosamente (Nishimura, 2001; Degim *et al*, 2002, Minami *et al*, 2001).

El quitosano es un polímero prometedor en la liberación génica, preparación de cultivos celulares y en la ingeniería de tejidos. La quitina y el quitosano exponen la actividad hipolipidémica, como se ha confirmado mediante la reducción de niveles de colesterol y de triglicéridos en la sangre e hígado de ratas (Nagyvary *et al*, 1979).

### **1.3.2.4 Propiedades antimicrobianas.**

La capacidad antimicrobiana del quitosano, es útil en la medicina, la agricultura y en conservación de alimentos (Allan & Hadwiger, 1979). Se ha demostrado que inhibe el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, y *Staphylococcus aureus*, (Hadwiger, 1984; Uchida *et al*, 1989) y hongos como: *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Drechtera sorokiana*, *Micronectriella nivallis*, *Piricularia orizae*, *Rhizoctonia solana*, *Trichophyton equinum* (Plascencia *et al*, 2003).

La acción antimicrobiana está influenciada por factores intrínsecos como el tipo de quitosano, el grado de depolimerización, el hospedero, la composición nutritiva y química del sustrato, pH del medio de cultivo, condiciones ambientales y la presencia o ausencia de sustancias que interfieran como lípidos y/o proteínas (Pacheco, 2010).

La manera exacta en la que el quitosano y sus derivados actúan es todavía desconocida, aun así varios mecanismos han sido propuestos, por ejemplo, la interacción entre la carga positiva de las moléculas de quitosano y las cargas negativas de las membranas celulares alterando su permeabilidad y permitiendo la pérdida de constituyentes intracelulares (Rabea *et al*, 2003).

### **1.3.3 Obtención de quitina**

#### **1.3.3.1 Método químico**

El método químico para la obtención de quitina a partir de exoesqueletos de crustáceos, consiste en una desproteínización de éstos con álcalis a temperatura moderada, una desmineralización con ácidos diluidos, una eliminación de lípidos con disolventes orgánicos y blanqueo mediante agentes decolorantes; el orden de los dos primeros pasos dependen de los subproductos que se deseen obtener (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003; Shahidi & Abuzaytoun, 2005). En el caso de la desmineralización, se han utilizado diferentes tipos de ácidos tanto fuertes como HCl, HNO<sub>3</sub> o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o débiles CH<sub>3</sub>COOH y HCOOH. El objetivo es la solubilización del carbonato de calcio (Percot *et al*, 2003; Lamarque *et al*, 2005), estudios han demostrado la desmineralización completa del desecho cuando la concentración del ácido es estequiométricamente mayor que la de la cantidad de minerales.

El blanqueo de la quitina solo se realiza cuando es indispensable tener un producto completamente puro. Por lo general para el blanqueo se utilizan soluciones de hipoclorito de sodio, acetona absoluta, cloroformo, peróxido de hidrógeno, acetato de etilo, etanol o una mezcla de ellos (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003; Percot *et al*, 2003).

Una de las grandes desventajas del método de purificación químico de la quitina, es el consumo de energía además de la producción de desechos corrosivos de ácidos y álcalis que contaminan el ambiente y tienen que ser tratados, además de producir degradación del polímero. Otra gran desventaja es que las proteínas extraídas mediante estos métodos no pueden ser reutilizadas ya que pierden valor debido a la formación de lisinoalanina y otros derivados de aminoácidos (Beaney *et al*, 2005).

#### **1.3.3.2 Método Biológico**

Estudios bioquímicos y estructurales durante los ciclos de desarrollo de crustáceos sugieren la degradación de la vieja cutícula mediante hidrólisis de las proteínas y la quitina mediante diversas enzimas; los productos obtenidos son recuperados y reutilizados para la síntesis de la nueva cutícula, esto mediante la acción de enzimas. Debido a la eficiencia de los mecanismos biológicos en la desmineralización, desproteínización e hidrólisis de la quitina en la naturaleza, diversos estudios se han enfocado en la utilización de métodos biológicos para la extracción de quitina como una alternativa al método químico (Bustos *et al*, 1994).

Existen estudios en los que se han evaluado enzimas enfocadas en la hidrólisis de las proteínas ligadas al desecho (Duarte De Hollanda & Netto, 2006), proteasas adicionadas,

propias al desecho o producidas por microorganismos internos. El uso de fermentaciones busca solubilizar los minerales ligados al desecho mediante la producción de ácidos orgánicos (Rao *et al*, 2000; Cira *et al*, 2002; Wang *et al*, 2005) así como utilizar las enzimas provenientes de vísceras presentes en el desecho para eliminar las proteínas.

#### **1.3.3.2.1 Fermentación ácido láctica (FAL)**

La fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta que produce compuestos orgánicos. El proceso de fermentación donde el producto final es el ácido láctico (fermentación láctica) se lleva a cabo por bacterias lácticas (BL), hongos, protozoos y en tejidos animales (Pacheco, 2010).

El uso de fermentaciones ácido lácticas para la extracción de quitina, no solo permite recuperar este biopolímero de manera más amigable, si no también permite resolver el problema ambiental que generan la producción de grandes cantidades de desechos de crustáceos, y recuperar compuestos de valor agregado (Pacheco, 2010).

Las bacterias utilizadas son las BL, las cuales producen ácido láctico (AL) a partir de una fuente de carbono adicionada al medio, el ácido producido genera un descenso en el pH durante las primeras horas de fermentación lo que evita el crecimiento de microorganismos de descomposición; el AL reacciona con el carbonato de calcio presente en el desecho para producir lactato de calcio el cual precipita y puede ser removido mediante lavados. Simultáneamente las enzimas proteolíticas producidas por el microorganismo o presentes en el desecho, llevan a cabo la desproteínización en combinación con la temperatura y el pH.

##### **1.3.3.2.1.1 Propiedades de la FAL.**

FAL de desechos de camarón (*Litopenaeus vanameii*) es un método biológico efectivo para recuperación de la quitina, pues evita su despolimerización. También la producción de quitosano con alta estructura cristalina, aumenta su potencial de uso en aplicaciones biomédicas, debido al incremento en su tasa de biodegradación, actividad inmunológica, así como por sus mejores propiedades mecánicas y reológicas en diferentes formas físicas (Pacheco, 2010).

#### **1.3.4 Obtención de quitosano**

Las condiciones de desacetilación como la temperatura, la concentración de álcali, el tiempo de procesamiento y las propiedades de las materias primas, afecta a las características del quitosano obtenido y por lo tanto sus aplicaciones (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003; Hwang *et al*, 2002).

##### **1.3.4.1 Método químico**

Existen dos tipos de desacetilación química: la homogénea y heterogénea, la primera se lleva a cabo a bajas temperaturas o a temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo, con lo que se asegura la uniformidad de la reacción (Nemtsev *et al*, 2002) y la



distribución de los grupos acetil resultante es arbitraria. La desacetilación heterogénea se realiza a una elevada temperatura (100 a 140°C) durante un corto período de tiempo se realiza más rápidamente en las regiones amorfas (Nemtsev *et al*, 2002; Zhang *et al*, 2006). Proporcionando una distribución de bloque que impide una mayor desacetilación.

En ambos casos, un alto DA puede ser alcanzado con éxito a pesar de la reducción en el tamaño del polímero (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003; Nemtsev *et al*, 2002). Se han llevado a cabo varios estudios para prevenir la degradación de la cadena en condiciones alcalinas fuertes (Rudrapatnan *et al*, 2003; Lamarque *et al*, 2005). Se ha sugerido que la estructura cristalina inicial de la quitina es un parámetro importante en la desacetilación y afecta a la estructura final del quitosano, así como la masa molecular y el DA, influyendo en su solubilidad, la reactividad para la modificación química, propiedades biológicas, mecánicas y reológicas (Shahidi & Abuzaytoun, 2005). La desacetilación de la quitina realizada con álcalis concentrados a altas temperaturas para su transformación a quitosano (Zhang *et al*, 2006), puede llevar a la degradación de la quitina (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003).

### **1.3.5 Copolimerización**

#### **1.3.5.1 Copolímeros a base de quitosano**

La quitina y el quitosano son polímeros naturales, que exhiben excelentes propiedades biológicas tales como la biodegradación en el cuerpo humano, inmunológicos, antibacterianos, y con actividad de curación en las heridas, Por lo que resultan buenos candidatos como material de apoyo para la entrega de genes o plásmidos, para el cultivo celular y la ingeniería tisular. Sin embargo, el uso práctico de la quitina y quitosano está principalmente limitado a las formas no modificadas. Es por ello que el método de copolimerización por funcionalización en la quitina y el quitosano es un estudio importante para introducir características deseadas modificando las propiedades químicas y físicas de estos polímeros, ampliando sus funciones y las posibles aplicaciones (Nemtsev *et al*, 2002).

Como ya se mencionó estos polímeros tienen dos tipos de grupos reactivos en donde puede llevarse la funcionalización. En primer lugar, los grupos amino libres en las unidades desacetiladas y en segundo lugar, los grupos hidroxilo en los carbonos C3 y C6 en las unidades acetiladas y desacetiladas (Jayakumar *et al*, 2005). La obtención de derivados del polímero por funcionalización en las cadenas de quitosano ha sido ampliamente estudiado. Por ejemplo, con altas concentraciones de NaOH, la quitina se vuelve alcalina quitina, que reacciona con 2-cloroetanol para producir O-(2-hidroxietil) quitina, conocida como la quitina del glicol: este compuesto fue probablemente el primer derivado para encontrar un uso práctico (sustrato recomendado para la lisozima) (Hirano *et al*, 1993).

En la tabla 1 se presentan los diferentes métodos, tales como los radicales libres, radiación, por funcionalización catiónico y enzimático en quitosano; las formas obtenidas del quitosano injertado y las aplicaciones actuales del quitosano copolimerizado.

**Tabla 1.** Copolímeros de quitosano métodos de obtención, presentaciones y aplicaciones (Jayakumar *et al*, 2005).

Compuesto de funcionalización	Iniciador o Reacción	Forma del copolímero	Aplicación o usos	Referencia
<b>Funcionalización iniciado por radiales libres</b>				
Poli- acrilamida o sus derivados	Cerio nitrato de amonio	Gel termorreversible , microsferas	Material inyectable para células y entrega de fármacos, formación de cartílago	Kim <i>et al</i> , 2000
Poli (metacrilato de metilo)	Terc-Butilhidroperóxido (TBHP)	Microsferas	Potador de genes	(Hsu <i>et al</i> , 2002)
Hidroxipropil quitosano-MAA	Persulfato amonio	Hojuelas	Mayor soluciones actividad antimicrobiana	Xie <i>et al</i> , 2002
Ácido Maléico sodio (MAS)	Persulfato amonio	Películas u hojuelas	Antioxidante, antibacterial	Sun <i>et al</i> , 2004
Poli (3-hidroxi-butilato)	N-acilación	Buen formador de películas	Parcial solubilidad en agua	Yalpani <i>et al</i> , 1991
Polianilina	Persulfato amonio	Películas gruesas y fibras	Conductor cuando se pronona.	Yang <i>et al</i> , 1989
poli(alcohol vinílico) (PVA)	Cerio nitrato de amonio	Microsferas	Acarreador de fármacos.	Yilmaz <i>et al</i> , 1998
Poli(vinilo acetato) (PVAc)	Cerio nitrato de amonio	Membranas	Tensoactivo, aumenta la dureza y disminuye la absorción de agua.	Don <i>et al</i> , 2002
Poli(acrilonitrilo)	Cerio nitrato de amonio	Escamas	Recuperar metales catiónicos	Pourjavadi <i>et al</i> & Omidian, 2003
Poli (ácido acrílico)	Cerio nitrato de amonio	Microsferas	Portador de fármacos hidrofílicos y proteínas sensibles.	Yilmaz <i>et al</i> , 1998
<b>Funcionalización por irradiación</b>				
N, N'-Dimetilaminetil metacrilato (DMAEMA)	$\gamma$ -irradiación	Películas	Recubrimientos para protección térmica	Singh and Roy, 1997
Acrlato de butilo	$\gamma$ -irradiación	Películas	Recubrimiento de semillas	Yu <i>et al</i> , 2003
Poli(hidroxietil metacrilato)	UV	Microsferas, perlas	Inmovilización de enzimas o biosensor electroquímico.	Ng <i>et al</i> , 2001
Poli(dimetilsiloxano )	UV	Hidrogel sensible a pH	Nuevo sistema de liberación de fármacos.	Kim <i>et al</i> , 2002
Poliacrilonitrilo	Microondas	Hidrogel	Nuevo sistema de liberación de fármacos.	Singh <i>et al</i> , 2005
<b>Funcionalización enzimático</b>				
Compuestos fenólicos	Tirosinasa	Gel y granos	Conferir solubilidad en medio ácido o básico, recuperación de colorantes aniónicos.	Kumar <i>et al</i> , 1999
Colágeno	Tirosinasa	Hidrogel sensible a PH	Andamios para la regeneración ósea	(Chen <i>et al</i> , 2003)
Colágeno	Transglutaminasa	Hidrogel	Andamios para la	(Chen <i>et al</i> , 2003)

		sensible a PH	regeneración ósea	
<b>Galato dodecil fenólico</b>	Peroxidasa	-----	Método de descontaminación de agua	Vachoud <i>et al</i> , 2001
<b>Polimerización por funcionalización catiónico</b>				
<b>Poli(isobutil vinil éter)</b>	catión poli(2-methyl-2-oxazolina)	Polvo	Aumentar solubilidad	Yoshikawa <i>et al</i> , 1998
<b>Otros</b>				
<b>Poli (etilen glicol)</b>	PEG- aldehído 1-etil-3-(3-dimetilamino propil) carbadiimida (EDC) ,DMF	Microesferas	Controlar las interacciones hifrofóbicas - hidrofílicas para el entrega de fármacos, compatibilidad con sangre.	Ouchi <i>et al</i> , 1998
<b>Carboximetil</b>	Ácido cloroacético	películas	Incrementa en quitosano la actividad antimicrobiana, reducción de bolsas periodontales en odontología.	Sun <i>et al</i> , 2003
<b>Hidroxietil metacrilato (HEMA)</b>	Polimerización de plasma.	Membranas	Proceso de diálisis	Li <i>et al</i> , 2003
<b>Ácidos carboxílicos</b>	Reacciones de Schiff o anhídridos carboxílicos	-----	Quelantes Adsorción de cationes metálicos, colorantes catiónicos.	Muzzarelli <i>et al</i> , 1984, 1985; Muzzarelli 1985; 1986; Saucedo <i>et al</i> , 1992; Guillén <i>et al</i> , 1992, 1994.
<b>Derivados de fosforo</b>	Reacción del pentaóxido de fósforo u oxicluro fósforo ácido fosfórico por la reacción de Mannich	Polvos	Recuperación de metales pesados en efluentes industriales.	Heras <i>et al</i> , 2001; Ramos <i>et al</i> , 2003
<b>Compuestos de azufre</b>	reacción directa con sulfuro de carbono, ácido acético mercapto, glutaraldehído	Resinas	Quelantes, Recuperación de metales pesados y preciosos.	Ruiz <i>et al</i> , 2002, 2003; Muzzarelli and Tanfani 1982; Ni & Xu 1996; Guibal <i>et al</i> , 2000; Asakawa <i>et al</i> , 2000; Cárdenas <i>et al</i> , 2001; Guibal <i>et al</i> , 2002.

### 1.3.6 Aplicaciones

Las propiedades específicas de la quitina, el quitosano y sus derivados, los hacen útiles a nivel industrial: En la agricultura pueden funcionar como inductores de mecanismos de defensa en las plantas y como recubrimiento de frutos postcosecha; en tratamiento de aguas, residuales como agente floculante; en la industria alimenticia, como aditivo; en cosméticos, como agente hidratante y recientemente en farmacéutica, como agente en biomedicina (Rabea *et al*, 2003; Synowiecki & Al-Khateeb, 2003).

La quitina presenta una baja toxicidad, es inerte en el tracto intestinal de mamíferos, es biodegradable debido a la presencia de quitinasas distribuidas ampliamente en la naturaleza en bacterias, hongos y plantas, así como en el sistema digestivo de diversos animales, la quitina se ha usado para preparar columnas de cromatografía por afinidad,

para inmovilización de enzimas como absorbente de compuestos contaminantes, como complejos de tiosulfato de plata, o como fibras en farmacéutica (Rinaudo, 2006d; Kumar, 2000).

El quitosano se ha estudiado por más de 40 años en posibles aplicaciones biomédicas como geles, películas y fibras (Khor & Lim, 2003), como floculante para la recuperación de proteínas, descontaminación, en la elaboración de soluciones, entre otras (Muzzarelli, 1973). Los principales avances prometedores en la actualidad están en los campos farmacéuticos y biológicos (Rinaudo, 2006d; Ravi Kumar *et al*, 2004; Hejazi & Amiji, 2002; Griesbach *et al*, 1999).

En resumen, el quitosano se utiliza para preparar hidrogeles, películas, fibras, esponjas, etc. En la mayoría de los materiales que se utilizan en los ámbitos biomédicos es en donde se requiere su biocompatibilidad (Khor & Lim, 2003; Ravi Kumar *et al*, 2004; Hejazi & Amiji, 2002; Griesbach *et al*, 1999; Illum & Davis, 2005; Thanou & Junginger, 2005; Suzuki *et al*, 1986; Suh & Matthew, 2000; Shi *et al*, 2006) como en la sanación de heridas y apósitos(vendajes), agente de entrega de fármacos, agente contra el colesterol, anti-coagulante, agente anti-tumoral, inmunoadyuvantes (Teng *et al*, 2001), plantilla para funcionalización de piel, agente hemostático y membrana de hemodiálisis (Kumar, 2000) (Agnihotri & Aminabhavi, 2004).

El quitosano se ha estudiado ampliamente por sus propiedades y en esta tesis se ha mencionado lo suficiente, por lo que se prosigue a describir el otro material usado en este proyecto de investigación.

## 1.4 Poli (ácido láctico) (PLA)

### 1.4.1 Definición

El PLA pertenece a la familia de poliésteres alifáticos, comúnmente hecho de  $\alpha$ -hidroxi ácidos (Garlotta, 2002). Es uno de los pocos polímeros en los que la estructura estereoquímica puede ser fácilmente modificada por la polimerización de una mezcla controlada de los isómeros L y D (Figura 4) para dar polímeros de alto peso molecular, amorfos o semi-cristalinos. Además, el PLA es un termoplástico que puede ser adaptado a la formulación que implique la adición de plastificantes, otros biopolímeros, rellenos, etc.

El PLA se considera como biodegradable (por ejemplo en envases desechables) y como biocompatible en contacto con los tejidos vivos (por ejemplo, para aplicaciones biomédicas tales como implantes, suturas, encapsulación de fármacos, etc.).

El PLA puede sufrir degradación abiótica (es decir, simple hidrólisis del enlace éster sin requerir la presencia de enzimas para catalizar). Durante el proceso de biodegradación, y sólo en un segundo paso, las enzimas degradan los oligómeros residuales hasta la mineralización final (degradación biótica) (Avérous, 2008).

El monómero básico (ácido láctico) se produce a partir de recursos renovables (hidratos de carbono) por fermentación, el PLA se ajusta al concepto que va en aumento en todo el mundo de desarrollo sustentable y está clasificado como un material ecológico (Avérous, 2008). Los polímeros biodegradables presentan una amplia gama de propiedades y en la actualidad empiezan a competir con los polímeros termoplásticos no-biodegradables en diferentes campos (embalaje, textil, biomédica, etc.). PLA fue aprobado por la FDA de los EE.UU. alrededor de la década de los setenta (Wang *et al*, 2003a; Wang *et al*, 2003b; Sarazin *et al*, 2004) y ha recibido una atención creciente en los últimos 20 años (Wilks Verlag & Weinheim, 2002; Auras *et al*, 2004; Drumright *et al*, 2000) principalmente por ser biodegradable, biorenovable, un recurso biointeligente, con alta capacidad de procesamiento y como sustituto viable de plásticos dependientes de petróleo (Jun, 2000; Ikada & Tsuji, 2000; Rasal *et al*, 2010; Lim *et al*, 2008).

PLA puede ser producido con un gran número de técnicas. Esta comercialmente disponible y en gran medida, con un precio razonable. Por ejemplo, la capacidad de producción de PLA de Cargill Dow (EE.UU.) en 2006 fue de 140 kTon por año de 2-5 euros por kilo. Otras compañías, como Mitsui Chemical (LACEA-Japón), Treofan (Países Bajos), Galáctica (Bélgica), Shimadzu Corporation (Japón), producen cantidades más pequeñas. Algunos de ellos se centran únicamente en el mercado biomédico, como Boeringher Ingelheim (Alemania), Purac (Países Bajos) o Phusis (Francia), debido a las limitaciones de este mercado que es muy específico. Sin embargo, según diversas fuentes, el consumo de PLA en 2006 fue de sólo alrededor de 60 000 toneladas por año, y en la actualidad, sólo el 30 % de ácido láctico se utiliza para la producción de PLA. Así, este biopolímero presenta un alto potencial para el desarrollo. (Avérous, 2008)

## **1.4.2 Precursores de PLA.**

### **1.4.2.1 Ácido láctico (precursor monomérico de PLA)**

Es un compuesto que juega un papel clave en varios procesos bioquímicos. Por ejemplo, el lactato se produce constantemente y se elimina durante el metabolismo normal y en el ejercicio físico. El ácido láctico se ha producido a escala industrial desde el final del siglo XIX y se utiliza principalmente en la industria alimentaria como un regulador de acidez, también en cosméticos, productos farmacéuticos y alimentos para animales. Se puede obtener ya sea por fermentación de carbohidratos o por síntesis química común. El ácido láctico es uno de los más simple  $\alpha$ -hidroxilo ácido con un átomo de carbono asimétrico y dos configuraciones ópticamente activas, isómeros L y D (Figura 4), que puede ser producido en sistemas bacterianos, mientras que los mamíferos sólo producen el isómero L, que es fácilmente asimilable durante el metabolismo.

El ácido láctico es principalmente preparado en grandes cantidades (alrededor de 200 kTon/año) por la fermentación bacteriana de los carbohidratos. Estos procesos de fermentación se puede clasificar de acuerdo con el tipo de bacteria utilizada: (i) el método heterofermentativo, que produce menos de 1,8 moles de ácido láctico por mol de hexosa, con otros metabolitos; (ii) el método homo-fermentativa, con mayores rendimientos de ácido láctico y niveles más bajos de subproductos, este se utiliza principalmente en procesos industriales (Hartmann, 1998). El rendimiento de conversión de la glucosa a ácido láctico es más del 90 por ciento. El método principal de separación consiste en neutralizar el ácido y obtener soluciones solubles de lactato que se filtran para eliminar la biomasa y los productos insolubles. El producto es cristalizado por evaporación, y reacidificado con ácido sulfúrico para obtener el ácido láctico crudo. Si el ácido láctico se utiliza en aplicaciones farmacéuticas y alimentos, el método de purificación es más largo para eliminar los residuos de los subproductos. Si se va a polimerizar, es purificado por técnicas de separación que incluyen la ultrafiltración, nanofiltración, electrodiálisis y los procesos de intercambio iónico (Avérous, 2008).

### **1.4.2.2 Láctido**

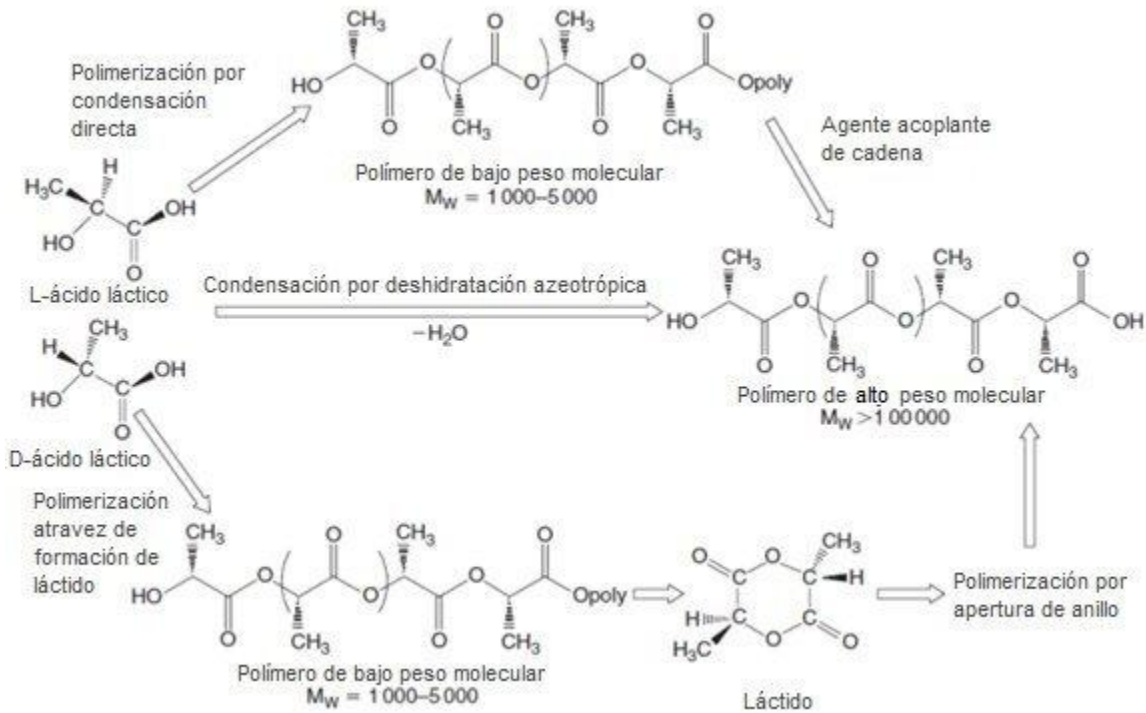
El dímero cíclico del ácido láctico combina dos de estas moléculas y da lugar al L-láctido o LL-láctido, D-láctido o DD-láctido, y meso-láctido o LD-láctido (una molécula de ácido L-láctico asociada con otra molécula de ácido D-láctico). La figura 3 muestra las estereoformas diferentes del láctido. Una mezcla de L- y D-láctido es un láctido racémico (rac-láctido). El L-láctido se obtiene normalmente mediante la depolimerización de PLA de bajo peso molecular bajo presión reducida para dar una mezcla de L-, D- y meso-láctido. Los diferentes porcentajes de los isómeros de láctido formado dependerán del isómero de ácido láctico usado como materia prima, la temperatura, la naturaleza y el contenido del catalizador (Hartmann, 1998; Auras *et al*, 2004). Un punto clave en la mayoría de los procesos es la separación entre cada estereoisómero para controlar la estructura final del PLA (por ejemplo, destilación al vacío) que se basa en las diferencias del punto de ebullición entre el meso y el L-o D-láctido.



**Figura 3.** Estructuras de L-, meso- y D-láctidos.

### 1.4.3 Síntesis de PLA

La síntesis de PLA es un proceso de múltiples pasos que comienza a partir de la producción de ácido láctico y termina con su polimerización (Garlotta, 2002; Hartmann, 1998; Auras *et al*, 2004; Metha *et al*, 2005; Sodergard & Stolt, 2002). Un paso intermedio es a menudo la formación del láctido. La figura 4 muestra que la síntesis de PLA puede seguir tres rutas principales. Algunas de esas rutas de síntesis pueden ser en solución o en masa, ambas llevan a la síntesis de PLA, el medio en que se elija dependerá del producto que se quiera obtener (Sodergard & Stolt, 2002).



**Figura 4.** Métodos de síntesis para obtener PLA de alto peso molecular (Hartmann, 1998).

#### 1.4.3.1 Policondensación de ácido láctico

La polimerización por condensación es la ruta menos costosa, pero es difícil por este método obtener pesos moleculares altos. El uso de agentes promotores de esterificación se requiere para aumentar la longitud de las cadenas (Hartmann, 1998; Auras *et al*, 2004),

pero a expensas de un aumento tanto del costo y la complejidad (proceso de múltiples etapas). El papel del agente consiste en reaccionar ya sea con el hidroxilo (OH) o los grupos terminales carboxilo del PLA (Auras *et al*, 2004; Hartmann, 1998; Sodergard & Stolt, 2002) dando así polímeros telequéricos (Hiltunen *et al*, 1996). Las ventajas son: que las reacciones implican pequeñas cantidades de ellos, son económicos. Las desventajas son que el polímero final puede contener agentes sin reaccionar, oligómeros e impurezas metálicas residuales del catalizador. Además, algunos agentes podrían estar asociados con una falta de biodegradabilidad (Garlotta, 2002). Ejemplos de agentes promotores de esterificación son los anhídridos, isocianatos y epóxidos (Hiltunen *et al*, 1997). Las desventajas del uso de isocianatos es su (eco) toxicidad; porque aumentan los pasos y costos para su purificación, ya que producen subproductos que deben ser neutralizados o eliminados (Hartmann, 1998). Las ventajas de la esterificación que promueven adyuvantes son que el producto final es altamente puro y está libre de oligómeros y/o de catalizador residual.

#### **1.4.3.2 Condensación por deshidratación azeotrópica**

La segunda vía es la condensación deshidratante azeotrópica de ácido láctico. Es un método utilizado para obtener longitudes de cadena alta sin el uso de amplificadores de cadena o coadyuvantes y sus inconvenientes asociados. Mitsui Chemicals (Japón) ha comercializado un proceso en donde los reactantes son deshidratados azeotrópicamente para obtener PLA de alto peso molecular ( $M_w \geq 300\ 000$ ) (Garlotta, 2002; Hartmann, 1998).

#### **1.4.3.3 Polimerización por apertura de anillo (PAA).**

El tercer proceso y principal es la polimerización por apertura de anillo (PAA) del láctido para obtener PLA puro de alto peso molecular ( $M_w \geq 100\ 000$ ) (Auras *et al*, 2004; Metha *et al*, 2005; Sodergard & Stolt, 2002; Stridsberg *et al*, 2001), patentada por Cargill (EE.UU.) en 1992 (Doi & Steinbüchel, 2002). Finalmente, las unidades de ácido láctico puede ser parte de una arquitectura macromolecular más compleja como en los copolímeros.

La PAA del láctido se demostró por primera vez por Carothers *et al* en 1932, pero polímeros de alto peso molecular no se obtuvieron hasta el mejoramiento de las técnicas de purificación del láctido y fueron desarrolladas por DuPont en 1954 (Garlotta, 2002). El mecanismo implicado en la PAA puede ser iónico (aniónico o catiónico) o la coordinación de inserción en función del sistema catalítico (Auras *et al*, 2004; Metha, Kumar *et al*, 2005; Sodergard & Stolt, 2002; Stridsberg *et al*, 2001). El papel de la racemización y el grado de transesterificación en la homo o copolimerización, también son decisivos para la pureza enantiomérica y la arquitectura de la cadena de las macromoléculas resultantes. Se ha encontrado que el trifluorometano sulfónico y su éster metílico son los únicos iniciadores catiónicos conocidos para polimerizar láctido (Kricheldorf & Sumbel, 1989). El mecanismo general para esta polimerización aniónica se ha discutido en diversas publicaciones (Garlotta, 2002; Hartmann, 1998; Kricheldorf & Sumbel, 1989; Kurcok *et al*, 1995).



Para el uso industrial y comercial, es preferible hacer la polimerización en masa fundida y con bajos niveles de catalizadores no tóxicos. Se ha encontrado que el peso molecular elevado PLA puede obtenerse con facilidad en presencia de compuestos de metales de transición de estaño (Metha *et al*, 2005; Sodergard & Stolt, 2002; Stridsberg *et al*, 2001), zinc (Williams *et al*, 2003; Chabot *et al*, 1983), hierro (Stolt & Sodergard, 1999) y de aluminio (Dubois *et al*, 1991), entre otros. Una investigación sistemática ha conducido a la amplia utilización de compuestos de estaño, es decir, estaño (II) bis-2-etilhexanoico (octato estañoso) como un catalizador en la síntesis de PLA. Esto se debe principalmente a su alta eficiencia catalítica, su baja toxicidad, para estar en contacto con alimentos y medicamentos y la capacidad de dar gran peso molecular, con racemización baja (Kricheldorf & Sumbel, 1989).

También se ha encontrado que el rendimiento de polimerización y el efecto de transesterificación se ven afectados por diversos parámetros, tales como la temperatura y el tiempo de polimerización, la relación monómero / catalizador y el tipo de catalizador. La interacción entre el tiempo y la temperatura es muy significativa en términos de limitar las reacciones de degradación, que afectan el peso molecular y la cinética de reacción (Schwach *et al*, 1994). También se ha demostrado que la longitud de la cadena es controlada directamente por la cantidad de impurezas OH (Du *et al*, 1995). Para la mayoría de las aplicaciones biomédicas, la toxicidad del catalizador es un tema muy delicado. El catalizador puede ser desactivado por la adición de ácido fosfórico o puede ser precipitado y filtrado mediante la adición de ácidos fuertes tales como el ácido sulfúrico. Así, el contenido residual del catalizador puede reducirse a ppm (Hartmann, 1998).

#### **1.4.4 Propiedades**

##### **1.4.4.1 Cristalinidad y propiedades térmicas**

Las propiedades físicas del PLA están relacionadas con la pureza enantiomérica del ácido láctico y estéreo-copolímeros. Homo-PLA es una macromolécula lineal con una arquitectura molecular que está determinada por su composición estereoquímica. El PLA puede ser producido totalmente amorfo o con hasta 40 % de cristalinidad. Las resinas PLA que contienen más de 93 % de ácido L-láctico son semi-cristalinas, pero, cuando contienen 50-93 % de éste es completamente amorfo. Tanto el meso- y D-láctido inducen torsiones en la arquitectura regular de Poli (L-ácido láctico) (PLLA). Las imperfecciones macromoleculares son responsables de la disminución en la velocidad y el grado de cristalización del PLLA. En la práctica, la mayoría de PLA se componen de L y D,L-láctido copolímeros, ya que los medios de reacción a menudo contienen algunas impurezas meso-láctido (Avérous, 2008).

Dependiendo de las condiciones de preparación, PLLA cristaliza en formas diferentes. La  $\alpha$ -forma exhibe un patrón bien definido de difracción. Esta estructura, con una temperatura de fusión de 185 °C, es más estable que su  $\beta$ -contraparte, que funde a 175°C (Hoogsten *et al*, 1990). Esta última forma se puede preparar en una alta relación y alta temperatura de elaboración (Tsuji *et al*, 2000). La  $\gamma$ -forma está formada por cristalización

epitaxial (Cartier *et al*, 2000). Se ha observado que una mezcla con un contenido equivalente de poli (L-láctido) PLLA y poli (D-láctido) PDLA dan la formación estéreo-complejos (cristales racémicos) de ambos polímeros. Este estéreo complejo tiene mayores propiedades mecánicas que las de ambos PLA, y una temperatura de fusión más alta de 230 °C.

La tasa de cristalización aumenta con la disminución en el peso molecular y es fuertemente dependiente de la composición (co) polímero (Auras *et al*, 2004). PLLA puede cristalizar en la presencia de D-láctido (Tsuji & Ikada, 1995), sin embargo, como la estructura se vuelve más desordenada, la velocidad de cristalización disminuye. La velocidad de cristalización está determinada esencialmente por la disminución en el punto de fusión de los diferentes copolímeros (Anderson & Hillmyer, 2006). El enfriamiento disminuye el tiempo de cristalización (Tsuji & Ikada, 1995). La orientación de la cadena aumenta la resistencia mecánica del polímero. Si la orientación se realiza a baja temperatura, el PLLA resultante tiene un módulo de Young más elevado sin ningún aumento significativo de la cristalinidad.

Para determinar los niveles de cristalinidad se utiliza la calorimetría diferencial de barrido (DSC), el valor más frecuentemente mencionado en la literatura acerca de la entalpía de fusión del PLA con un 100 % de cristalinidad, es de 93 J g<sup>-1</sup> (Sodergard & Stolt, 2002; Doi & Steinbüchel, 2002; Martin & Avérous, 2001). Por ejemplo, el PLLA que presenta un grado de cristalinidad del 37% tiene alta resistencia a la tensión y baja elongación. Sus características térmicas están definidas por un punto de fusión entre (175-178°C) y una temperatura de transición vítrea de 60-65°C (Drumright *et al*, 2000; Hutchinson *et al*, 2006; Perepelkin, 2002). Yasuniwa *et al*, en 2004 encontraron un punto de fusión doble en polímeros PLLA y lo atribuyeron a la disminución de las tasas de cristalización y recristalización.

La típica temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>) para el PLA oscila entre 50 °C a 80 °C, mientras que sus rangos de temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) van de 130 °C a 180 °C. Por ejemplo, el PLA enantioméricamente puro es un polímero semi-cristalino con una T<sub>g</sub> de 55 °C y una T<sub>m</sub> de 180 °C. Para PLA semicristalino, la T<sub>m</sub> es una función de los diferentes parámetros de procesamiento y la estructura inicial del PLA. De acuerdo con Ikada y Tsuji (2000), T<sub>m</sub> aumenta al aumentar el peso molecular (M<sub>w</sub>) a un valor asintótico, pero la cristalinidad real disminuye con el aumento del M<sub>w</sub>. Además la T<sub>m</sub> disminuye con la presencia de unidades meso-láctido en su estructura (Auras *et al*, 2004). Ambos, el grado de cristalinidad y la temperatura de fusión de materiales a base de PLA se puede reducir por copolimerización al azar con comonomeros diferentes (por ejemplo. Ácido glicólico, caprolactona o valerolactona). La T<sub>g</sub> de PLA también está determinada por la proporción de los diferentes estereoisómeros de láctido en su cadena macromolecular.

#### **1.4.4.2 Solubilidad**

Un buen disolvente para el PLA y para la mayoría de los copolímeros correspondientes es el cloroformo. Otros disolventes clorados o fluorados son compuestos orgánicos, dioxano, dioxolano y furano. El poli (rac-láctido) y poli (meso-láctido) son solubles en muchos otros

disolventes orgánicos como acetona, piridina, lactato de etilo, tetrahidrofurano, xileno, acetato de etilo, dimetilformamida, metil etil cetona. Entre los no-disolventes, los compuestos más relativos son agua, alcoholes (por ejemplo. Metanol y etanol) y alcanos (por ejemplo hexano y heptano) (Sodergard & Stolt, 2002).

#### **1.4.4.3 Propiedades mecánicas**

Las propiedades mecánicas de los materiales de PLA pueden variar desde materiales blandos y elásticos a materiales de elevada resistencia y rigidez, de su cristalinidad, la estructura del polímero y el peso molecular, la formulación del material (plastificantes, mezclas, compuestos, etc.) y procesamiento (la orientación). Por ejemplo, el PLA comercial, como poli (92 % L-láctido, 8 % meso-láctido), tiene un módulo de 2,1 GPa y un alargamiento antes de la ruptura de 9 %. Después de la plastificación, el módulo de Young se reduce a 0,7 MPa y el alargamiento antes de la ruptura se eleva a 200 %, con el correspondiente cambio de  $T_g$  de 58 ° C a 18 ° C (Martin & Avérous, 2001). Este ejemplo indica que las propiedades mecánicas pueden ser fácilmente ajustadas para satisfacer diferentes aplicaciones. Las propiedades mecánicas del PLA relacionadas con polímeros fueron revisados recientemente por Sodergard & Stolt, (2002), que informan sobre el aumento de módulo de fibras de PLLA de 7-9 GPa a 10-16 GPa al pasar de la fusión a la solución de hilado. El PDLLA proveniente de los dos isómeros tiene baja resistencia a la tensión, alta elongación y una elevada velocidad de degradación (Perrin & English, 1997; Garlotta, 2002; Gunatillake & Adhikari, 2003 Metha *et al*, 2005). El comportamiento mecánico también puede ser modificado por la preparación de copolímeros adecuados como en el caso del empleo de caprolactona que con sus segmentos blandos, induce una disminución en el módulo y un aumento en el alargamiento a la ruptura, respectivamente.

#### **1.4.5 Copolímeros de PLA**

##### **1.4.5.1 Copolimerización basado en unidades de ácido láctico**

Gran número de arquitecturas macromoleculares de copolímeros basados en ácido láctico han sido investigados (Sodergard & Stolt, 2002; Stridsberg *et al*, 2001). La mayoría de ellos son biodegradables y/o biocompatible. Estos copolímeros se pueden preparar mediante el uso de unidades que contienen una estructura funcionalizada específica, dando lugar a una estructura compleja con propiedades únicas. Ejemplos de estos materiales que están ramificados son los poliésteres y copolímeros de injerto (estrella, polímeros hiper-ramificados) que tienen diferentes arquitecturas macromoleculares asociados a diversos materiales con nuevas propiedades y aplicaciones.

##### **1.4.5.2 Copolimerización por apertura de anillo**

Varios monómeros heterocíclicos pueden utilizarse como comonómeros con ácido láctico en copolimerizaciones de apertura de anillo, el más comúnmente utilizado es el glicólido (GA) para aplicaciones biomédicas (Gilding & Reed, 1979), caprolactona (CL) y valerolactona. Las unidades de comonómeros pueden ser insertadas en las secuencias al azar o de bloque.

#### **1.4.5.3 Modificaciones por alta energía de radiación y peróxidos**

Reacciones de radicales aplicadas a PLA para modificar su estructura, han sido generadas con peróxidos o radiación de alta energía. Siendo la ramificación el cambio estructural dominante en el poli (L-láctido) (PLLA) que se produce con concentraciones de peróxido entre 0.1-0.25%(peso) y un entrecruzamiento por encima de 0.25%(peso) (Sodergard & Stolt, 2002). La reacción de fundición de PLA con peróxido, causa fuertes modificaciones de las propiedades originales del PLA. Un enfoque similar se ha desarrollado recientemente con mezclas a base de almidón, sin ninguna mejora importante en sus propiedades mecánicas (Schwach, 2004). La irradiación de PLA causa principalmente escisiones de cadena o reacciones de reticulación, dependiendo de la intensidad de la radiación (Gupta & Deshmukh, 1983).

#### **1.4.5.4 Copolimerización por entrecruzamiento**

Los copolímeros por injerto se utilizan a menudo como compatibilizadores para mejorar las propiedades interfaciales de mezclas o sistemas multifásicos. Las reacciones de injerto en el tronco de un polímero pueden inducirse químicamente, por descarga de plasma, o por radiación (rayos UV, rayos X o electrones acelerados), este último enfoque confiere a sus productos mayor calidad a altas conversiones. El injerto inducido por plasma se realiza mediante la introducción de un vapor orgánico en un plasma de gases inorgánicos para modificar las propiedades superficiales de un sustrato. Dependiendo de la profundidad de penetración de la irradiación, el injerto se puede realizar tanto en la superficie, o en ambos, en la superficie y en la parte interna donde penetró la radiación (Sodergard & Stolt, 2002). La modificación química del ácido láctico basado en polímeros por copolimerización de injerto se ha reportado para el homopolímero de L-láctido y de copolímeros con diferentes contenidos L-láctido/caprolactona (Sodergard & Stolt, 2002; Stridsberg *et al*, 2001). Polímeros de carbohidratos (por ejemplo Amilosa) pueden ser modificados por injerto de cadenas de ácido láctico en sus grupos OH. Un estudio reciente (Schwach, 2004) mostró el interés de un copolímero como un compatibilizador para mejorar las propiedades de las mezclas de almidón/PLA en una mejor medida que la adición de peróxidos o agentes de acoplamiento (por ejemplo Di-isocianato) en la mezcla fundida durante el procesamiento.

Como un polímero sintético biocompatible y biodegradable, el PLLA es ampliamente utilizado en ingeniería de tejidos. El PLLA tiene excelentes propiedades mecánicas, se utiliza en la fijación de los huesos fracturados en cirugía ortopédica, así como de implantes orales en forma de placas, clavos, tornillos y cables. Además, se puede utilizar como andamios porosos 3D para la regeneración ósea.

#### **1.4.6 Aplicaciones**

El PLA ha sido ampliamente estudiado para su uso en aplicaciones médicas debido a su bioreabsorción y propiedades biocompatibles en el cuerpo humano. Los principales ejemplos son: dispositivos de fijación de fracturas como clips, tornillos y placas, suturas reabsorbibles, sistemas de liberación controlada de fármacos (Chen *et al*, 1997; Lu *et al*,

2000) y las placas de micro-valoración (Doi & Steinbüchel, 2002); en ultrasonido, como agentes de contraste, y de guía en el nervio (Wang *et al*, 2003a y 2003b).

Los materiales basados en PLA se han desarrollado para la producción de tornillos y placas. A medida que la curación del hueso progresa, es deseable que el hueso se someta a un aumento gradual de la tensión, reduciendo así el efecto de blindaje a la tensión. Esto sólo es posible si la placa pierde rigidez en ambientes *in vivo*. Para satisfacer esta necesidad, los investigadores introdujeron polímeros reabsorbibles para aplicaciones de placas óseas. El PLA se reabsorbe o se degrada tras la implantación en el cuerpo, pero la mayoría de sus propiedades mecánicas se pierden dentro de unas semanas (Ramakrishna *et al*, 2001). Tormala *et al* en 1991 propuso compuestos totalmente reabsorbibles mediante el fortalecimiento de las matrices con fibras reabsorbibles de PLLA y fibras de vidrio a base de fosfato de calcio. Una de las ventajas citadas con frecuencia para prótesis reabsorbibles compuestas es que no necesitan ser eliminadas con un segundo procedimiento quirúrgico, como ocurre con los implantes de compuestos metálicos o no reabsorbibles. Para mejorar las propiedades mecánicas, el PLA se refuerza con la variedad de materiales no reabsorbibles, incluyendo fibras de carbono y poliamida. Fibras compuestas de carbono / PLA poseen propiedades mecánicas muy elevadas antes de su implantación, pero las pierden rápidamente *in vivo* debido a la delaminación. Los efectos a largo plazo de los productos reabsorbibles, y fibras bioestables o lentamente erosionables en los tejidos vivos no se conocen plenamente, y es un asunto que todavía no se ha resuelto (Ramakrishna *et al*, 2001).

Las fibras de PLA se utilizan en diferentes aplicaciones textiles como, por ejemplo, el textil no-tejido para ropa, que alcanzó su primer éxito comercial como sutura reabsorbible, siendo uno de los primeros productos médicos disponibles comercialmente, basado en copolímeros de ácido glicólico en combinación con L-láctido (Vicryl) (Albertsson & Varma, 2003). Las fibras pueden ser producidas tanto por disolvente y por procesos de hilado por fundición y elaboradas bajo diferentes condiciones para orientar las macromoléculas (Sodergard & Stolt, 2002).

Por otro lado se sabe que las micro y nanopartículas son una categoría importante de los sistemas de aplicación deliberación utilizados en la medicina, y el uso de PLA es interesante debido a su degradabilidad hidrolítica y baja toxicidad. Las propiedades más importantes de las micro- y nanopartículas son la tasa de liberación del fármaco y la tasa de degradación de la matriz, que se ven afectados por el diseño de las partículas y las propiedades del material (Sodergard & Stolt, 2002). Por su parte el PDLLA es un material muy atractivo para los sistemas de degradación de fármacos (Garlotta, 2002; Perrin & English, 1997; Metha *et al*, 2005; Gunatillake & Adhikari, 2003). Así también, los copolímeros de glicólico y rac-láctido (Zhang & Sun, 2005) parecen ser las combinaciones más adecuadas para su uso como matrices de liberación de fármacos. Se ha encontrado que los andamios porosos de PLA son matrices potenciales de reconstrucción para los tejidos y órganos dañados. Existen varias técnicas reportadas para la fabricación de tales materiales (Sodergard & Stolt, 2002).

## Antecedentes

En cuanto a la preparación y extracción de quitosano y quitina, Pacheco *et al*, (2011) reportaron la extracción de quitina de la fermentación ácido láctica, usando como materia prima desechos de camarón (*Litopenaeus vannameii*), con un grado de desmineralización máxima ( $D_{MIN}$ ) del 92% y una desproteínización ( $D_{PROT}$ ) del 94%. Al final de FAL la quitina extraída biológicamente (Bio-C) presentó un  $M_w$  de 1,200 kDa, que es mayor que la quitina extraída químicamente (Qui-C) y la quitina comercial (C-Co) que mostraron un  $M_w < 900$  kDa. Los  $M_w > 900$  kDa después de la extracción de quitina química ha sido reportado por Percot *et al*, en 2003 que se refiere a la hidrólisis parcial de los biopolímeros, debido al contacto con el ácido y/o condiciones de alcalinidad. Estos resultados indican que FAL minimiza la degradación del biopolímero (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003). Además, la producción de masa en FAL fue de 45%, que es superior a la alcanzada por el método químico (37%) (Pacheco *et al*, 2011).

La quitina obtenida biológicamente (Bio-C) presentó el mayor índice de cristalinidad ( $I_{CR}$ ) (86.4%) que la quitina extraída químicamente Qui-C y la quitina comercial C-Co. De acuerdo con este resultado, el tratamiento relativamente suave del proceso de extracción semi-biológico conserva la cristalinidad. Stawski *et al*, informó un  $I_{cr}$  de hasta un 85% en una  $\alpha$ -quitina obtenida por el método químico. El aumento del tamaño de los cristales durante FAL se podría considerar como una estimación de purificación de la quitina, ya que al parecer provoca la cristalización posterior (Pacheco *et al*, 2011).

El quitosano obtenido de esta quitina tiene un grado de acetilación (DA) del 10% y un  $M_w$  medio de 400 kDa mayor que el de quitosano obtenido de Qui-C. Además la aplicación de una desacetilación heterogénea para su obtención, ayuda a conservar la estructura cristalina de la quitina. Por lo tanto se tiene un quitosano con una alta cristalinidad (Pacheco *et al*, 2011).

Por otro lado, debido a las buenas propiedades biológicas del quitosano y a las buenas propiedades mecánicas del PLA estos materiales se han unidos para formar copolímeros que tengan mejores propiedades y ampliar sus aplicaciones; respecto al tema algunos trabajos de investigación han sido reportados.

Yao *et al* en 2003 han preparado el quitosano-funcionalización-PLLA para su posible aplicación en ingeniería de tejidos. En donde la resistencia a la tensión del copolímero quitosano-g-PLLA se incrementó conforme aumentó la relación de alimentación hasta una relación de 2 PLLA / quitosano, después de eso, la elevación del PLLA / quitosano da como resultado una disminución de la resistencia a la tensión (Yao *et al*, 2003).

Por funcionalización directa del PLLA en los grupos amino de quitosano sin utilizar ningún catalizador, en soluciones acuosas, el copolímero de quitosano-g-PDLLA se encontró que era un hidrogel sensible al pH (Qu *et al*, 1999) debido a la agregación de las cadenas

laterales hidrofóbicas, con un uso potencial en la liberación controlada de fármacos en las regiones específicas del tracto gastrointestinal (Qu *et al*, 1999).

Además, con el método de polimerización PAA empleando L-Láctico se sintetizó un copolímero de quitina-g-PLA y quitosano-g-PLA (Suyatma *et al*, 2010). La PAA permite controlar arquitecturas moleculares y también es el método preferido para materiales de alto peso molecular (Rasal *et al*, 2010; Gunatillake & Adhikari, 2003).

Ding *et al*, (2004), prepararon un copolímero de quitosano-PLLA con superficie rica en PLLA con funcionalización biodegradable, esto se logró mediante el acoplamiento de la reacción de plasma de PLLA con quitosano. Este polímero derivatizado puede ser utilizado para controlar la morfología y función de las células y tiene posibles aplicaciones en ingeniería de tejidos.

Sin embargo, en las diferentes investigaciones los resultados mostraron que la cristalinidad del quitosano disminuye gradualmente después de la funcionalización, ya que se sustituyen las propiedades del grupo  $-NH_2$  del quitosano por derivatización de cadenas laterales al azar a lo largo de la cadena y se destruye la regularidad de unión entre las cadenas del quitosano.

# Justificación

Los procedimientos químicos para la extracción de la quitina implican la generación de productos secundarios corrosivos no deseados y la reducción dramática en los pesos moleculares (Shahidi & Abuzaytoun, 2005). Es por ello que se han propuesto enfoques biológicos como una alternativa para la recuperación de la quitina (Duarte De Hollanda & Netto, 2006; Rao *et al*, 2000; Shirai *et al*, 2000). Siendo la fermentación del ácido láctico (LAF) el método más eficaz para recuperación de la quitina, pues evita su despolimerización. Además el carbonato de calcio es solubilizado *in situ* por el ácido láctico (AL) y las proteasas endógenas son activadas hacia desproteínización (Cira *et al*, 2002; Shirai *et al*, 2001; Bhaskar *et al*, 2007).

La quitina obtenida biológicamente puede proporcionar buena materia prima para la producción de quitosanos con alta estructura cristalina, y extender su uso en aplicaciones biomédicas, debido al incremento en su tasa de biodegradación, actividad inmunológica, adhesión celular, favoreciendo propiedades mecánicas y reológicas en diferentes formas físicas (Pacheco, 2010).

Actualmente, los quitosanos en general presentan algunas limitaciones como sensibilidad a la humedad, baja elasticidad y solubilidad; por otro lado los materiales sintéticos biodegradables tales como el poliláctido y sus copolímeros tienen una alta resistencia inicial y baja hidrofiliencia pero presentan baja degradación y adhesión celular, lo que resulta en una pobre compatibilidad con tejidos blandos (Liu *et al*, 2004). La manera más viable para superar las limitaciones de ambos polímeros es combinarlos. Es por ello que la copolimerización por funcionalización resulta ser una técnica atractiva para acoplar las diversas propiedades de los polímeros con base a los grupos funcionales para reducir sus limitaciones y ampliar sus aplicaciones, desarrollando nuevos materiales (Liu *et al*, 2004).

Con base en los datos reportados por el Instituto Nacional de Geografía y Estadística, en México se registran anualmente alrededor de 115 mil casos de quemaduras en México, de los cuales, 11 mil 500 personas son hospitalizadas y el 20 por ciento con quemaduras de segundo grado profundo y tercer grado. En estas últimas afectan tanto la capa externa como la capa subyacente de la piel, extendiéndose hasta tejidos más profundos; produciendo una piel de coloración blanquecina, oscura o carbonizada que puede estar entumecida, es decir, sin sensibilidad por la pérdida de nervios (Marx *et al*, 2002).

La ingeniería de tejidos ha demostrado ser una alternativa viable para la reconstrucción de la piel en heridas o quemaduras con pérdida del tejido (Llames *et al*, 2006), sin embargo no muchos pacientes tienen acceso a este tipo de tratamiento por su alto costo, atribuido al precio de los materiales usados en estos tratamientos. Es por ello, que en el campo de la ingeniería de tejidos se utilizan cada vez más materiales biodegradables y bioabsorbibles (como los sintetizados en este trabajo), como una fuente de andamios dérmicos.



# Hipótesis

Los copolímeros de quitosano-g-PLA preparados por reacciones de policondensación o por apertura de anillo permitirán la adhesión celular conservando la propiedad antimicrobiana.

# Objetivos

## General

Sintetizar y caracterizar materiales de quitosano biológico-químico y derivados del ácido láctico.

## Particulares

- Preparar y caracterizar quitosanos a partir de quitina obtenida por método biológico-químico.
- Sintetizar quitosano-poliláctido por polimerización en masa y por apertura de anillo (PAA).
- Caracterizar fisicoquímicamente los materiales obtenidos.
- Evaluar la adhesión celular sobre los andamios de quitosano-derivados de ácido láctico.

## 6. Materiales y Métodos

Este proyecto de investigación se realizó en tres etapas; en la primera etapa la obtención de quitina y quitosano, la segunda etapa la síntesis y caracterización de los copolímeros y la tercera etapa pruebas biológicas de estos materiales.

### 1a Etapa- Obtención de quitina y quitosano.

#### 6.1 Elaboración de quitosano

##### 6.1.1 Obtención de quitina cruda

###### 6.1.1.1 Materiales

El desecho de camarón del género *Litopenaeus sp.* compuesto de cabezas fueron obtenidos en el mercado central de pescados y mariscos de la ciudad de México (La Nueva Viga). Este desperdicio fue molido en un molino para carne (Torrey 32-3, México) y conservado a -20 °C hasta su posterior utilización. Se utilizó la cepa de *Lactobacillus sp.* (B2) aislada de desperdicios de camarones tropicales (Shirai *et al*, 2001) Se inoculó en medio Man, Rogosa and Sharpe (MRS) y se incubó durante 24 h a 30 °C.

###### 6.1.1.2 Fermentación ácido láctica (FAL)

La FAL fue llevada en un reactor tipo columna, en el cual se colocó la mezcla de desechos de camarón, 5% (v/p) del inóculo de *Lactobacillus sp.* (B2) y 10% (p/p) azúcar de caña. Se mantuvo en una cámara con temperatura controlada a 30°C durante 120 h (Cira *et al*, 2002). Se tomó muestra líquida cada 24 h para su posterior análisis. Después de las 120 h de la fermentación la fracción sólida en la que se encontraba la quitina cruda se secó en campana de extracción a temperatura ambiente para su posterior purificación y obtención de quitosano.

##### 6.1.2 Obtención de quitina pura

###### 6.1.2.1 Despigmentación de la quitina cruda.

Se realizó con acetona en relación 1:15 (p/v) por 1 h a 25 °C, transcurrido el tiempo de reacción, el material se filtró y la quitina se secó en campana de extracción (Cira *et al*, 2002) para su posterior desmineralización.

###### 6.1.4.2 Desmineralización química de la quitina cruda

La desmineralización fue llevada a cabo con una solución de HCl (0.4M), relación (1:15) (p/v) por 1 h a 25 °C. Posteriormente el producto fue lavado con agua corriente hasta la neutralidad y secado en campana de extracción a temperatura ambiente (Cira *et al*, 2002) para su posterior desproteínización.

###### 6.1.4.3 Desproteínización química de la quitina cruda

Se realizó con una solución de NaOH (0.4 M), relación (1:15) (p/v) por 1 h a 25 °C. Después de terminada la reacción se lavó el producto con agua corriente hasta la neutralidad, se secó en campana de extracción a temperatura ambiente (Cira *et al*, 2002). Una vez finalizado el proceso anterior se obtiene la quitina pura esta es guardada para su posterior caracterización y desacetilación a quitosano.

#### 6.1.4.5 Purificación de quitina cruda (método termoquímico).

La purificación de la quitina cruda obtenida se realizó con HCl (1M) y NaOH (1M) conforme a las condiciones determinadas por Cira *et al*, en 2002 para su posterior determinación de %N.

#### 6.1.3 Desacetilación de la quitina pura (obtención de quitosano)

Se llevó con una solución de NaOH al 50% (p/v) con una relación (1:15) (p/v) en un reactor tipo columna con agitación alta a 100 °C por 2 h. Terminado el proceso el producto fue enjuagado con agua corriente hasta la neutralidad, secado en campana a temperatura ambiente para su análisis y caracterización (Juárez, 2010).

### 6.2 Caracterización de los materiales

#### 6.2.1 Determinación de pH y ácido total titulable (ATT)

El pH se determinó de las muestras líquidas de la fermentación usando un potenciómetro. El ATT fue determinado por titulación potenciométrica, para ello, la muestra se diluye en agua destilada en relación 1:15 (p/v) se adicionó NaOH 0.1N (valorado) hasta un pH final de 8 (A.O.A.C., 1980). Se asumió que la bacteria solo producía ácido láctico, por lo tanto 1.0 ml de NaOH es equivalente a 0.009 g de ácido láctico (90 g/mol). El ATT, expresado como porcentaje de ácido láctico fue calculado con la ecuación 1:

$$\%ATT = (\text{Volumen del titulante} * 0.009 * N(\text{alcali}) * 10) * 100 \quad (1)$$

#### 6.2.2 Análisis químico proximal

##### 6.2.2.1 Determinación del contenido de humedad

Fue determinado después de secar 1 g de muestra en crisoles a peso constante durante 24 h a 100 °C en una estufa con temperatura controlada, calculando el porcentaje por diferencia de pesos con la ecuación 2 (A.O.A.C., 1980).

$$\%H = \left[ \frac{\text{Peso del crisol con muestra sin humedad} - \text{Peso del crisol}}{\text{Peso de la muestra}} * 100 \right] - 100 \quad (2)$$

##### 6.2.2.2 Determinación del contenido de cenizas

Se determinó el contenido de cenizas en las muestras secas por combustión en una mufla a 650 °C, por 12 h, determinando la diferencia de pesos con la ecuación 3 (A.O.A.C., 1980).

$$\%C = \left[ \frac{\text{Peso del crisol con cenizas} - \text{Peso del crisol}}{\text{Peso de la Muestra seca.}} \right] * 100 \quad (3)$$

##### 6.2.2.3 Determinación del contenido de grasa (%G)

Se calculó después de la cuantificación de sustancias extraíbles con éter de petróleo por diferencias de pesos con la ecuación 4 (A.O.A.C., 1980).

$$\%G = \left[ \frac{\text{Peso del vaso con grasa} - \text{Peso del vaso}}{\text{Peso de la muestra}} \right] * 100 \quad (4)$$

#### 6.2.2.4 Determinación de nitrógeno total

El nitrógeno total se determinó por el método de Kjeldahl, llevando a cabo en un aparato automático (Buchi, Suiza). En la cual se realiza una combustión con la muestra con ácido Sulfúrico concentrado (digestión) La reacción produce que el nitrógeno orgánico sea convertido a sulfato de amonio. Este último a amonio el cual es destilado con exceso de ácido bórico y determinado por titulación (Ecuación 5) (A.O.A.C., 1980).

$$\text{Nitrógeno total} = \text{Nitrógeno no proteico} + \text{Nitrógeno proteico} \quad (5)$$

#### 6.2.2.5 Nitrógeno Proteico (NP)

El porcentaje de nitrógeno proteico fue determinado por Kjeldahl, restando el nitrógeno de quitina al nitrógeno total y multiplicado por 6.25 (Ecuación 6) (Cira *et al*, 2002).

$$\% \text{Proteína residual} = (\text{Nitrógeno total} - \text{Nitrógeno de quitina}) * 6.25 \quad (6)$$

#### 6.2.2.6 Nitrógeno de Quitina (NQ)

El nitrógeno de quitina fue determinado por el método de Kjeldahl, después su purificación con ácido 1N y álcali 5% (p/v) durante 1 hora en baño maría (Cira *et al*, 2002).

### 6.2.3 Caracterización de quitosanos.

#### 6.2.3.1 Determinación de solubles

Se determinó disolviendo 0.1 g de muestra en 25 ml de una solución de ácido acético (0.1M) durante 24 h, con agitación constante a temperatura ambiente, determinando por gravimetría la cantidad de solubles en dicha solución (Shrinivas & Stevens, 2005).

#### 6.2.3.2 Grado de acetilación (DA)

La determinación del DA de los quitosanos se determinó por resonancia magnética nuclear de protón ( $H^1$  RMN), disolviéndolas en HCl/D<sub>2</sub>O, usando el espectrómetro Bruker CA 300 (Heux *et al*, 2000). Se determinó con la ecuación 7.

$$DA(\%) = \left[ \frac{\frac{1}{3} \text{Area integrada}_{CH_3 \text{ del ácido láctico}}}{\frac{1}{6} \sum_{i=2}^6 \text{Area integrada}_{H_i \text{ del quitosano}}} \right] * 100 \quad (7)$$

#### 6.2.3.3 Determinación del peso molecular mediante viscosidad intrínseca

Se calculó determinando viscosidad intrínseca (Mv) del quitosano en una solución de ácido acético (0.33M) y acetato de sodio (0.2M) con un viscosímetro Ubbelohde. Los parámetros se determinaron mediante la ecuación 8 y las constantes empleadas para a y k fueron las correspondientes al disolvente empleado (Shrinivas & Stevens, 2005) (Mao *et al*, 2007).

$$[\eta] = kMva \quad (8)$$

Donde  $k=1.38 \times 10^{-5} \text{ L g}^{-1}$ ;  $a=0.85$

### 2a Etapa – Síntesis y caracterización de materiales

En la segunda etapa del proyecto de investigación se llevó a cabo la síntesis de los diversos materiales así como su correspondiente caracterización.

### **6.3 Síntesis de los materiales (segunda etapa).**

#### **6.3.1 Síntesis de quitosano-g-ácido láctico por policondensación (QAL).**

La síntesis del material fue llevada a cabo disolviendo 1 g de quitosano en 40 ml de ácido láctico 0.5 N. La reacción se realizó a diferentes tiempos (1, 2, 3 y 4 h) determinándose el mejor rendimiento e incorporación.

Con el tiempo de reacción seleccionado se probaron quitosanos con DA diferentes ( $DA < 1$ ,  $1 < DA < 10$ ,  $10 < DA < 20$  y  $DA > 20$ ) para evaluar su efecto en la incorporación del ácido láctico. La solución fue distribuida en cajas petri, las cuales fueron puestas bajo vacío a 80 °C por 3 h y secadas a 40 °C por 24 h.

##### **6.3.1.1 Método de purificación del copolímero QAL.**

Las películas formadas se purificaron en un soxhlet con metanol en primera instancia (Qu *et al*, 1999), después se propusieron 3 métodos alternativos de purificación cambiando el metanol por acetona (Avérous, 2008) (por ser GRAS) para corroborar la formación del enlace amida y retirar por completo el monómero que no reaccionó. Los procedimientos empleados se detallan a continuación.

###### **6.3.1.1.1 Purificación del copolímero QAL por precipitación directa con acetona (dA)**

Después de la reacción la mezcla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, posteriormente la mezcla se precipitó en acetona en una proporción 1:10 (v/v) con respecto a la solución. El precipitado formado se filtró con papel Whatman No. 30 y se secó a 60°C durante 5h. El sobrenadante obtenido se colocó en un rotavapor R-205 (Büchi, Suiza) a 56°C y 60 rpm para recuperar la acetona.

###### **6.3.1.1.2 Purificación del copolímero QAL por precipitación directa, mezcla en frío con acetona a temperatura ambiente (dfA)**

Terminada la reacción de la mezcla de ácido láctico con el quitosano se dejó enfriar hasta 10 °C aproximadamente, después se precipitó con acetona en una relación de 1:10 (v/v) al volumen de la muestra, posteriormente se filtró (Whatman No. 30) y el sólido se secó en estufa a 60 °C por 5 h.

###### **6.3.1.1.3 Purificación del copolímero QAL por precipitación por goteo en frío con acetona fría (dfAf)**

Realizada la reacción, la mezcla se dejó enfriar hasta una temperatura de 10°C, a continuación la mezcla fue goteada en un matraz que contenía acetona en proporción 1:10 (v/v), que se encontraba en baño de agua-hielo (5°C). Formado el precipitado, se centrifugó a 9000 rpm por 30 min a 15°C. El precipitado se secó a 60°C durante 5h.

#### **6.3.2 Síntesis de quitosano-g-Poli (ácido láctico) por policondensación (QPAL).**

La síntesis se realizó conforme a lo reportado por Suyatma *et al* (2010), salvo pequeñas modificaciones. Se solubilizo 1 g de quitosano en 40 ml de ácido láctico 0.5N. Después se agregó 3g de D,L- ácido láctico al 85% y 1% de ácido p-Tolueno sulfónico (con respecto al ácido láctico) como catalizador. La solución se puso en un reactor y se purgo con nitrógeno. La reacción ocurrió a 80 °C por 24 h.

#### **6.3.2.1 Purificación del copolímero QPAL.**

Después de la reacción la mezcla se dejó enfriar hasta una temperatura de 10 °C. Posteriormente se añadió acetona en una proporción 1:10 (v/v) con respecto a la solución. Para recuperar el precipitado se realizaron dos métodos, una filtración con papel Whatman No. 30 y el otro, por centrifugación a 9000 rpm por 30 min a 15 °C. El copolímero se hidrató y se vació en cajas Petri, se pusieron a secar a 60°C durante 5h. El sobrenadante obtenido se colocó en un rotavapor R-205 (Büchi, Suiza) a 56°C y 60 rpm para recuperar la acetona.

#### **6.3.3 Síntesis de quitosano-g-Poli (láctido) por polimerización por apertura de anillo (PAA) (QPLA).**

El proceso de injerto de PLA en el quitosano fue mediante el método de polimerización de apertura de anillo basado en el método reportado por Kim *et al*, (2002) en el cual se disolvió 1 g de quitosano en 40 ml ácido láctico 0.5N, la solución se vació en un reactor, se agregó 4 g láctido al reactor y 0.5 ml de trietanolamina como catalizador, el reactor se purgó con nitrógeno. La reacción se realizó a 80 °C por 24h.

#### **6.3.2.1 Purificación del copolímero QPAL.**

Después de la reacción la mezcla se dejó enfriar hasta una temperatura de 10 °C. Posteriormente se añadió acetona en una proporción 1:10 (v/v) con respecto a la solución. Para recuperar el precipitado se centrifugó a 9000 rpm por 30 min a 15 °C. El copolímero se hidrató y se vació en cajas Petri, se pusieron a secar a 60°C durante 5h. El sobrenadante obtenido se colocó en un rotavapor R-205 (Büchi, Suiza) a 56°C y 60 rpm para recuperar la acetona.

#### **6.3.4 Síntesis de los copolímeros QAL, QPAL y QPLA con el quitosano L3.**

Cabe mencionar que el quitosano L3 fue obtenido con los resultados para síntesis del material descritos en la sección 7.2.1.1.2. Con las mejores condiciones de reacción y purificación encontradas para cada copolímero, se sintetizaron de nuevo los tres copolímeros pero ahora con el quitosano L3 como se describe a continuación.

##### **6.3.4.1 Síntesis de QAL con el quitosano L3.**

El quitosano se disolvió en ácido láctico, se llevó a cabo la reacción a 80 °C por 2h, posteriormente la solución fue vaciada en cajas Petri y secadas, la película se purificó en un Soxhlet con acetona por 12 h.

##### **6.3.4.2 Síntesis de QPAL con el quitosano L3.**

El quitosano se disolvió en ácido láctico, la solución se colocó en un reactor, al cual se le añadió el catalizador y el ácido láctico faltante se purgó y la reacción ocurrió por 24 h a 80°C. El copolímero en solución se precipitó en acetona en una relación 1:10 v/v, posteriormente se recuperó por centrifugación, se hidrató y se puso en cajas Petri para la formación de las películas.

##### **6.3.4.3 Síntesis de QPLA con el quitosano L3.**

El quitosano fue disuelto en ácido láctico, la solución se colocó en un reactor al igual que 0.5 ml del catalizador y láctido en una relación de 4:1 con respecto al quitosano, se purgó

el reactor y la reacción ocurrió a 80 °C por 24h. El material se precipitó con acetona, recuperado por centrifugación, se hidrató y vaciado en cajas Petri para la formación de las películas.

#### 6.4 Caracterización de los copolímeros.

En la mayoría de los experimentos los métodos se hicieron por 3 veces y con dos unidades experimentales por cada método, por lo que los datos se reportaron en promedio para facilitar el análisis de estos materiales.

##### 6.4.1 Determinación de rendimientos

Para obtener el rendimiento ( $R$ ) se consideró la cantidad de quitosano ( $Q$ ) y la cantidad de ácido láctico ( $A$ ) empleados, así como el peso del copolímero obtenido ( $QAL$ ) (ecuación 9).

$$\%R = \frac{\text{Peso del copolímeros (QAL)}}{\text{Peso del quitosano (Q)} + \text{Peso del ácido láctico(A)}} \times 100 \quad (9)$$

##### 6.4.2 Porcentaje de incorporación

Se estimó el porcentaje de incorporación de ácido láctico ( $\%In AL$ ) en forma gravimétrica tal como se muestra en la ecuación 10.

$$\%InAl = \frac{\text{Peso del copolímero(QAL)} - \text{peso del quitosano inicial (Qi)}}{\text{Peso del copolímeros (QAL)}} \times 100 \quad (10)$$

donde la cantidad de AL que reaccionó se obtiene considerando la cantidad de quitosano inicial ( $Q_i$ ) y la cantidad de copolímero obtenido ( $QAL$ ).

##### 6.4.3 Solubles y peso molecular del copolímero.

El quitosano solo es soluble en soluciones ácidas, una disminución en la solubilidad es una prueba del injerto del ácido láctico (Suyatma *et al*, 2010), por ello se realiza un prueba de determinación de solubles de los copolímeros en una solución de ácido acético al 0.1 N, como en la sección 6.2.3.1 (caracterización del quitosano). Para determinar el porcentaje de solubles del copolímero en solución de ácido acético se empleó la ecuación 11.

$$\%Solubles_{\text{Ác.acético (0.1M)}} = 100 - \left( \left[ \frac{\text{Peso del papel con muestra} - \text{Peso del papel}}{\text{Peso de la muestra}} \right] * 100 \right) \quad (11)$$

Para la determinación del peso molecular se llevó a cabo conforme a la metodología de la sección 6.2.3.3 y se calculó el peso molecular de cada compuesto con la ecuación 8.

##### 6.4.4 Espectroscopia de ATR-FTIR

Se utilizó un espectrómetro de infrarrojo (FTIR) con detector de reflectancia total atenuada (ATR) (Perkin Elmer ATR-FTIR 100, Inglaterra). Los espectros FTIR se registraron en un intervalo de onda de 650 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Para tal fin, las muestras fueron acondicionadas y se obtuvieron los espectros correspondientes colocando directamente en el detector los sobrenadantes obtenidos después de evaporar la acetona. Se emplearon las herramientas del programa computacional analítico SPECTRUM (V 6.3.5, Inglaterra) para realizar la identificación de las bandas características, promedios y comparaciones de las muestras (F2103-01, 2008).

#### 6.4.4.1 Incorporación evaluada en áreas

Para estandarizar las áreas y hacerlas comparables entre sí, se siguió el método de línea base descrito por Duarte *et al*, (2002) en donde se elige una banda de referencia (BR) la cual no debe de modificar su absorbancia al variar el porcentaje de incorporación del ácido láctico. Así mismo, se identificaron las bandas de prueba (BP) características tanto del quitosano y del ácido láctico y se les determinó el área en absorbancia. Se obtuvo una relación de BP y BR. Se utilizó la ecuación 12 para determinar la incorporación en áreas.

$$\text{Incorporación}_{\text{Áreas FTIR}} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{Área integrada}_{BP(LB)}}{\text{Área integrada}_{BR(LB)}} \quad (12)$$

#### 6.4.5 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (<sup>1</sup>H-RMN)

Para llevarse a cabo el análisis de <sup>1</sup>H-RMN, se disolvió el copolímero en agua deuterada (D<sub>2</sub>O) y ácido clorhídrico (HCl) concentrado. Los espectros de RMN fueron realizados en un espectrómetro (BRUKER modelo AVANCE-III 500, Alemania) empleando una BBID de 5mm con z-gradiente de campo. En todos los casos los espectros son adquiridos a 298°K a 500 Mhz .

##### 6.4.5.1 Relación molar (RM) y por ciento de fracción molar (%FM)

De los espectros de RMN obtenidos se integraron las áreas correspondientes al grupo metilo del ácido láctico (1.4 ppm) y los masivos A y B del quitosano, integrando las curvas con el programa "Spinworks" (V2.5.5, Canadá). Posteriormente los valores de las áreas obtenidos se sustituyeron en las ecuaciones 13 y 14.

$$RM = \left( \frac{\frac{1}{3} \text{Área integrada de los protones del CH}_3 \text{ del ácido láctico}}{\frac{1}{6} \sum_2^6 \text{Área integrada de los protones (Hi) del quitosano}} \right) \quad (13)$$

$$\%FM = \left( \frac{\frac{1}{3} \text{Área integrada CH}_3}{\frac{1}{6} \sum_2^6 \text{Área integrada Hi} + \frac{1}{3} \text{Área integrada CH}_3} \right) \times 100 \quad (14)$$

#### 6.4.6 Estabilidad térmica.

Los análisis térmicos se llevaron a cabo en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI-UNAM). Los análisis DSC se realizaron en un equipo Dupont DSC 2100 (US) en un intervalo de temperatura de -40 a 170 °C para el PLA, a una velocidad de calentamiento de 10°C min<sup>-1</sup>, bajo una atmosfera de nitrógeno. Los análisis de TG se realizaron en un TA Instruments Hi-Res TGA 2950 (US), en un intervalo de 0 a 400 °C para el quitosano y el PLA, en una atmosfera de nitrógeno, a una velocidad de calentamiento de 10°C min<sup>-1</sup>.

#### 6.4.7 Rayos X.

Se realizó un estudio de difracción de rayos X para determinar el índice de cristalinidad (I<sub>CR</sub>) y el tamaño aparente de cristal (D<sub>ap</sub>) usando las ecuaciones 15 y 16 (Siemens D-5000). Para el análisis de Rayos X se pulverizó el polímero y se analizó, con K $\alpha$  radiación de Cu a  $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ . Se utilizó en un grado de rotación de 3 a 80, durante un periodo de 30 minutos y un tamaño de paso de 0.02 mm.

$$I_{cr} = \left( \frac{\text{Intensidad del pico}_{110}(I_{110}) - \text{Intensidad del pico}_{\text{amorfo}}(I_{am})}{\text{Intensidad del pico}_{110}(I_{110})} \right) \times 100 \quad (15)$$



$$D_{ap} = \left( \frac{K\lambda}{\beta_0 \cos \theta} \right) \quad (16)$$

Donde K es una constante a 0.9,  $\lambda$  (angstroms) es la longitud de onda de radiación incidente,  $\beta_0$  (rad) es el ancho a la mitad de la altura del pico cristalino y  $2\theta$  es el ángulo de escaneo de la (110) línea de difracción.

#### 6.4.8 Determinación de las propiedades mecánicas de esfuerzo-deformación.

##### 6.4.8.1 Acondicionamiento de las películas.

Las películas se colocaron en un desecador para acondicionarse con base en lo establecido en el ASTM D618-00 (ASTMD618-00, 2003), en ambiente de humedad relativa y temperatura constantes (25 °C y 45 %HR) obtenidos con disoluciones saturadas de  $Mg(NO_3)_2$ , manteniendo las películas en dichas condiciones durante 48 horas antes de la determinación de las propiedades mecánicas.

**Medición del espesor:** El espesor de las películas fue medido después del acondicionamiento con un micrómetro (micrómetro digital) en 20 posiciones aleatorias para cada película, a lo largo de la muestra. Las propiedades mecánicas fueron calculadas considerando un valor de espesor promedio.

**Propiedades mecánicas:** Se evaluaron la fuerza de fractura en la punción y la fuerza de fractura en la extensión, para ello se utilizó la máquina de pruebas mecánicas SINTECH 1/S (MTS, USA) con una celda de carga de 100N, variando entre las dos pruebas (punción y extensión) las mordazas utilizadas.

##### 6.4.8.2 Fuerza de fractura en la extensión.

Se evaluó con base en el método estándar de la ASTM D882-97 (ASTMD882-97, 2003), a temperatura ambiente (25°C). Las películas previamente acondicionadas se cortaron en probetas de 1cm de ancho por 8cm de largo. Las probetas fueron sujetadas a las mordazas de la máquina, con una separación inicial de 5cm, generando posteriormente en ellas una extensión mediante estiramiento a una velocidad constante de 100mm/min, al mismo tiempo se fue registrando en la computadora la resistencia que se genera hasta la ruptura de la película. Se probaron 5 muestras por cada formulación.

##### 6.4.8.3 Fuerza de fractura en la punción.

Fue determinada con el método descrito por Gontard *et. al*, (1993). Las películas previamente acondicionadas fueron cortadas en círculos de 8cm de diámetro y fijada una a una entre un anillo metálico. Posteriormente la película se sometió a una compresión por medio de una superficie punzante, la cual fue puesta en movimiento dirigida en forma perpendicular hacia la superficie de la película a una velocidad constante de 100 mm/min. Al mismo tiempo se fue registrando (por medio de una computadora) la resistencia que se genera hasta llegar a los 2cm de longitud, no necesariamente a la ruptura de la película. Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente (25°C). Se evaluaron 5 muestras para cada material.

##### 6.4.8.4 Modulo de Young

Constante de proporcionalidad introducida en la ley de Hooke, la cual se puede calcular como:

$$\theta = \Delta\sigma / \Delta\varepsilon = E = \sigma / \varepsilon \quad (17)$$

Donde  $\sigma$  es el cambio en el esfuerzo unitario (kPa) y  $\varepsilon$  es la deformación unitaria

#### 6.4.9 Pruebas fisicoquímicas

##### 6.4.9.1 Porcentaje de Hinchamiento.

Se cortaron muestras de aproximadamente 1 x 1 cm las cuales debieron estar secas y se registró el peso inicial ( $W_0$ ) por triplicado. Se introdujo la muestra en un recipiente (frasco) y se añadió una cantidad conocida de solución acuosa (Medio Eagle Modificado de Dulbecco, DMEM), la cual fue acondicionada 37 °C (con el fin de simular condiciones fisiológicas del cuerpo). Se consideró una cantidad de solución suficiente para cubrir completamente la muestra. Se introdujo el recipiente a una estufa a 37 °C y cada 24 h se registró el peso del material.

##### 6.4.9.1.1 Porcentaje de Hinchamiento (%H).

Se sacó el recipiente con la muestra de la estufa y se retiró la muestra de la solución, con ayuda de un papel filtro, se removió suavemente la solución que queda superficialmente sobre ambas caras de la película. Se pesó inmediatamente la muestra y se registró el peso ( $W_h$ ). La muestra se regresó al recipiente con solución.

Se repitió hasta que la muestra alcanzó un peso constante ( $W_e$ ), es decir, hasta que no se observó cambios significativos en los pesos (no más de un 2% de coeficiente de variación).

El porcentaje de Hinchamiento a un tiempo  $t$  se obtuvo a partir de la ecuación 18.

$$\% H_t = \frac{W_h - W_0}{W_0} * 100 \quad (18)$$

Donde  $\% H_t$  fue el porcentaje de hinchamiento a un tiempo;  $W_h$  fue el peso de la muestra húmeda a un tiempo  $t$  y  $W_0$  fue el peso de la muestra seca. El porcentaje de Hinchamiento en el equilibrio se obtuvo a partir de la ecuación 19.

$$\% H_e = \frac{W_e - W_0}{W_0} * 100 \dots\dots\dots (19)$$

Donde  $\% H_e$  fue el porcentaje de hinchamiento en el equilibrio,  $W_e$  fue el peso de la muestra húmeda en el equilibrio y  $W_0$  fue el peso de la muestra seca.

##### 6.4.9.2 Porcentaje de erosión.

Se cortaron muestras de aproximadamente 1 x 1 cm (por triplicado) las cuales se liofilizaron y se registró su peso inicial ( $W_0$ ). Se introdujo la muestra en un recipiente (frasco con tapa) y se añadió una cantidad conocida de solución acuosa (Medio DMEM, composición Anexo A1), la cual fue acondicionada a 37 °C y pH 7.4 (con el fin de simular condiciones fisiológicas del cuerpo). Se debió considerar una cantidad de solución suficiente para cubrir completamente la muestra (5 mL de DMEM). Se introdujo el recipiente a una estufa a 37 °C y cada 2 días se retiró muestra para su análisis.

#### 6.4.9.2.1 Porcentaje de Erosión (%E).

Cada 48 h se sacó el recipiente con la muestra de la estufa y cuidadosamente se retiró la muestra de la solución. La muestra se liofilizó y se pesó inmediatamente se registró el peso ( $W_t$ ). El porcentaje de pérdida en masa o erosión a un tiempo  $t$  se obtuvo a partir de la ecuación 20.

$$\% \text{ Erosión} = \frac{W_f - W_0}{W_0} * 100 \quad (20)$$

donde  $\% E_t$  es el porcentaje de erosión a un tiempo  $t$ ,  $W_0$  es el peso inicial de la muestra seca a un tiempo  $t$  y  $W_f$  es el peso final de la muestra liofilizada.

#### 6.4.10 Determinación del ángulo de contacto.

Colocando 1  $\mu$ L de agua sobre las superficies de las películas formadas e inmediatamente se tomó una fotografía, utilizando un microscopio Intel® Qx3 (Intel, E.U.A.) conectando a una PC. El ángulo de contacto se midió usando el software Imagen J 1.34s.

### 3a Etapa - Pruebas biológicas

#### 6.5 Pruebas biológicas.

En estas pruebas se utilizaron los dos lotes de materiales, el primer lote correspondiente a los materiales sintetizados a base de quitosano C1, se empleó para establecer un protocolo estándar de acondicionamiento de éstos, es decir, el tamaño del copolímero para su uso, el número de lavados y con qué sustancias, la forma de procesarlos para su análisis con las células. El segundo lote de materiales se sintetizó conforme a las fallas encontradas con el primer lote y se le hicieron las mejoras pertinentes para lograr la adhesión celular y viabilidad de las mismas, utilizando el protocolo de acondicionamiento encontrado con el primer lote. Con el primer lote se hicieron 4 ensayos para establecer el protocolo de acondicionamiento de los materiales. Las micrografías de MEB, fluorescencia y visible de los tres primeros ensayos no se muestran en esta sección sino en el anexo A4 y se toman como representativas las del cuarto ensayo, ya que los 4 ensayos mostraron resultados similares y sin adhesión celular.

#### 6.5.1 Prueba de adhesión celular y viabilidad.

##### 6.5.1.1 Preparación de los copolímeros.

Las películas se cortaron en círculos de 8 mm de diámetro tomando en cuenta la medida de los pozos de las placas a usar y de su capacidad de hinchamiento (2 unidades experimentales y 1 control), estos se esterilizaron por UV en crosslinker BLX-254 (Vilber Lourmat), ambas caras del polímero por 10 min, posteriormente se le realizaron lavados con búfer PBS (por sus siglas en inglés de Phosphate buffered saline, pH 7.4, composición anexo A1), Medio DMEM/F12 basificado (pH 8 Y 0.01M) y medio plano (medio solo), por último en agua desionizada, después se dejaron secar por 24 h en campana de flujo laminar a temperatura ambiente.

##### 6.5.1.2 Sembrado sobre los polímeros

Se trataron muestras de piel para la obtención de fibroblastos humanos obtenidos de prepucios los cuales fueron cultivados en Medio DMEM/ F12 suplementado con suero bovino fetal y antibiótico (Anti- Anti 100X de gibco, composición anexo A1), por una semana (Llames *et al*, 2006). Después estas células fueron recuperadas de las cajas y se sembraron 60  $\mu$ l de esta solución que contenía  $9 \times 10^5$  células/mL, se dejaron incubar a 38 °C, 80% humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub> por alrededor de 1 h para la interacción de las células con el polímero, después de observarse al microscopio se le agregó el resto de medio equivalente para completar 200  $\mu$ l de medio.

#### **6.5.1.2.1 Pruebas con calceína (viabilidad celular y adhesión)**

Después de 5, 10 y 21 días de incubación los polímeros son sacados de los pozos y cortados a la mitad, una de las mitades es lavado dos veces con PBS y se retira, posteriormente se agregó al medio Hanks/Fenol con calceína y homodimero de etidio, se incubaron 37 °C por 45 min (Invitrogen, 2005). Transcurridos los 45 min se retira la solución y se lavó dos veces con PBS y se analizó en un microscopio invertido (Axio Observer A1, Carl Zeiss) con luz fluorescente.

#### **6.5.1.2.2 Microscopia electrónica de barrido (MEB)**

A la otra mitad del polímero con células se le realizaron 2 lavados con PBS de 5 min cada uno, enseguida se agregó glutaraldehído por 30 min. Posteriormente se retiró el glutaraldehído y se agregó PBS dejándolo hasta el siguiente día para su posterior análisis en el microscopio electrónico (ESEM XL30, Phillips).

#### **6.5.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana**

Los copolímeros fueron acondicionados previamente como la sección 6.5.1.1 para simular condiciones de cultivo celular, sin embargo, los lavados fueron realizados con caldo soya tripticaseína y por ultimo agua desionizada. La cepa empleada fue *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 2783) la cual fue conservada en Müller-Hinton a 4°C y el inóculo fue preparado en caldo tripticaseína a 36 °C por 12h.

La evaluación del crecimiento bacteriano se llevó a cabo mediante la inoculación de 10  $\mu$ L de la suspensión de bacterias a una concentración de  $1 \times 10^7$  bacterias/ml a caldo soya tripticaseína, se añadieron los materiales y se incubaron a 36 °C, se tomaron muestras cada 2 h hasta un tiempo final de 24 h (por duplicado) registrándose la absorbancia (595 nm).

# 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

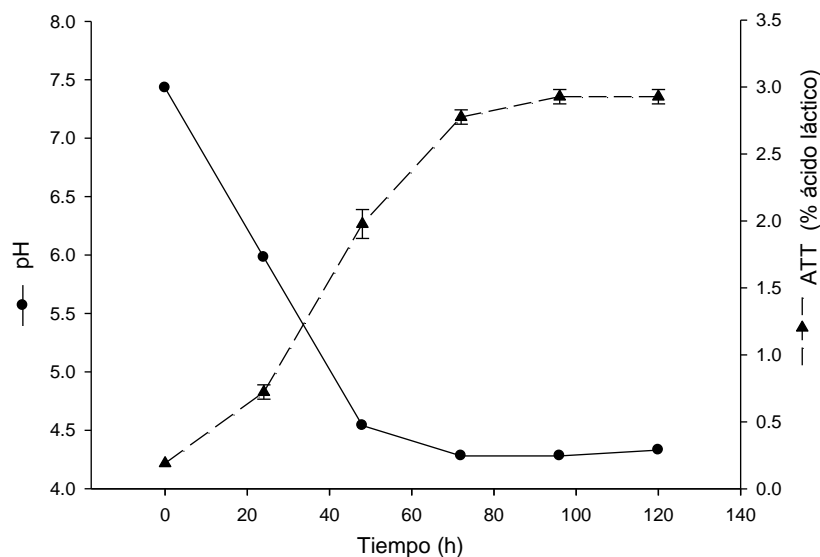
## 7.1 Obtención de quitosano y caracterización

### 7.1.1 Fermentación ácido láctica

Cuando la célula se encuentra en condiciones anaerobias, la fermentación responde a la necesidad de reoxidar el NADH y de esta manera continuar la reacción de producción de energía, y la oxidación del sustrato hasta compuestos como, ácido acético, etanol o ácido láctico. Este último interviene en el crecimiento de las bacterias competitivas y la inhibición de la microflora no deseable debido a la disminución del pH del medio. Por lo tanto, la fermentación láctica es el proceso que permite la recuperación de la quitina y de otros productos de valor agregado como pigmentos y minerales a partir de desechos de camarón (*Rao et al, 2000; Shirai et al, 1996; Shirai et al, 2000*).

#### 7.1.1.1 Determinación de pH y ATT en licor

Los cambios de pH en los procesos de acidificación fueron analizados en las fracciones líquidas del reactor durante las 120 h de la LAF. El pH inicial de 7.43 muestra un decremento durante las 72 h de la LAF hasta  $4.33 \pm 0.08$  y se mantuvo constante hasta el final del experimento (120h). Esto último debido tal vez a un proceso de inhibición por producto en donde los iones hidrógeno formados por la ionización del ácido láctico provocan un descenso del pH, inhibiendo a los microorganismos fermentativos provocando que la acidificación sea detenida más sin embargo, una producción ligera de ácido continua, de tal forma que los compuestos básicos (amonio, aminas, etc.) formados continuamente en el ensilado interactúen con los iones hidrógeno manteniendo el pH constante (*Shirai et al, 1996*).



**Figura 5.** Evolución del pH y ATT en las muestras líquidas de la LAF para la extracción biológica de quitina.

Por otra parte la ATT aumento de 0.72% a las 24 h hasta un valor de 2.93% a las 90 h y se mantuvo constante hasta el fin del experimento a las 120 h (Figura 5). Resultados similares fueron reportados por Cira *et al*, 2002 y Pacheco *et al*, 2009. En donde el pH inicial estaba entre 7.5 y 8 y el final de 4.2 a 4.6. Mientras que el valor final de ATT está por debajo del valor reportado por estos autores, pero similar a lo reportado por Juárez en 2010, esto tal vez porque solo se monitoreo el ATT en el licor y no en el sólido quedándose la mayor proporción de ácido en el sólido, como lo reporta la misma autora.

### 7.1.2 Análisis químico proximal

El análisis químico proximal de los desechos de camarón, quitina cruda, quitina pura y quitosanos se presentan en la tabla 2.

**Tabla 2.** Análisis químico proximal de los materiales, involucrados en la obtención de quitosano.

Material	Humedad (%)	Cenizas (%)	Grasa (%)	Proteína (%)
<b>Camarón</b>	76.45±0.19	20.32±0.41	7.24±0.76	22.30±0.38
<b>Quitina cruda</b>	11.82±0.33	15.81±0.41	5.53±0.13	6.94±0.04
<b>Quitina pura</b>	5.86±0.17	1.08±0.05	0.00±0.00	1.26±0.26
<b>Quitosano (L1)</b>	7.48±0.04	0.07±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00
<b>Quitosano (L2)</b>	8.02±0.04	0.06±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
<b>Quitosano (L3)</b>	7.51±0.11	0.09±0.01	0.00±0.00	0.00±0.00

Los resultados son promedios de dos determinaciones y sus desviaciones estándar.

L1 quitosano obtenido en condiciones atmosféricas con el primer lote de quitina.

L2 quitosano obtenido en una atmósfera sin oxígeno con el segundo lote de quitina.

L3 quitosano obtenido en condiciones atmosféricas con el tercer lote de quitina.

Se determinó un 69% de desmineralización (DM) un 88% de desproteínización (DP) mediante LAF. Estos valores se encuentran por debajo de lo reportado por Pacheco *et al*, (2009) quien obtuvo un 92% DM y 94 % DP y de los determinados por Cira *et al*, 2002, en cuanto al DM que fue de 87%. Esto pudo deberse a la disminución tan rápida del pH que creó una inhibición por producto de las bacterias, esto atenuado a la gran cantidad de agua en el camarón que al pasar al licor de manera rápida, lavó el ácido y parte de las bacterias de la fase sólida impidiendo la completa remoción de los minerales, en forma de lactato de calcio (Shirai *et al*, 2001). Por otro lado el valor de DP fue similar al reportado por Cira *et al*, (2002) de 87.6%, que se debe a la hidrólisis de las proteínas que son usadas como fuente de nitrógeno por las bacterias (Sini *et al*, 2007).

La purificación de la quitina cruda se realizó con las condiciones reportadas por Cira *et al*, (2002). Con este proceso termoquímico se obtuvo un DM del 98% y un DP del 95% a

partir de la quitina cruda; y de un DM del 99.45% y un DP del 99.41% a partir del desperdicio de camarón (Tabla 2).

El quitosano que se obtuvo a partir de la quitina pura y se realizó conforme a las mejores condiciones encontradas por Juárez (2010). La reacción se llevó a cabo en 2 diferentes atmósferas, saturado con nitrógeno y con aire. El quitosano obtenido en condiciones atmosféricas (L1) y sin oxígeno (L2) presentaron contenidos de cenizas y proteínas por debajo de los reportados por Juárez (2010) (Tabla 2). El tercer lote de quitosano se preparó bajo condiciones atmosféricas, sin embargo, se dejó 1 h más la reacción debido a que se necesitaba desacetilar más la molécula para evaluar el efecto del grado de acetilación en la síntesis de los materiales.

### 7.1.3 Caracterización de quitosanos

El grado de acetilación (DA), peso molecular ( $M_v$ ) y el porcentaje de solubles en solución de acético (0.1 M), de los quitosano, se presentan en la Tabla 3 y se compararon con quitosanos comerciales. Los valores obtenidos de DA de la desacetilación heterogénea son 24% para L1 y 22% para L2, valores por debajo de los obtenidos por Juárez en (2010) bajo las mismas condiciones.

**Tabla 3.** Peso molecular ( $M_v$ ), grado de acetilación (DA) y por ciento de solubles de los quitosanos en ácido acético (0.1 M).

Muestra	Método de desacetilación	DA (%)	$M_v$ ( $1 \times 10^3$ g mol <sup>-1</sup> )	Solubles en ácido acético (0.1 M) (%)
Comercial <sup>a</sup>	FPT <sup>b</sup>	0.68	319	ND
Comercial <sup>c</sup>	Comercial	>10 <sup>d</sup>	550 <sup>d</sup>	ND
Comercial <sup>e</sup>	Comercial	>10 <sup>d</sup>	416	ND
Quitosano (C1) <sup>f</sup>	Heterogénea	15	400	88
Quitosano (L1)	Heterogénea	24	1216	33
Quitosano (L2)	Heterogénea	22	1354	34
Quitosano (L3)	Heterogénea	9.8	959	94

<sup>a</sup> Kitomer (Montreal, Canada) peso molecular medio (Pacheco *et al*, 2008).

<sup>b</sup> Tres ciclos desacetilación heterogénea con FPT (Pacheco *et al*, 2008).

ND es No determinado

<sup>c</sup>Fluka Biochemika (USA) peso molecular alto (Pacheco *et al*, 2008).

<sup>d</sup> Valores reportados por el proveedor (Pacheco *et al*, 2008).

<sup>e</sup>Fluka Biochemika peso molecular medio (Pacheco *et al*, 2008).

<sup>f</sup>Proporcionado por Juárez (2010).

Por otro lado, los  $M_v$  de los quitosanos fueron altos con respecto a los reportados en la literatura, no obstante, los que se obtuvieron en presencia de oxígeno (L1 y L3)

presentaron un menor  $M_v$  que el que se procesaron en atmósfera de nitrógeno, esto debido a que el oxígeno en la desacetilación heterogénea es uno de los factores que promueve la degradación del polímero (Pacheco *et al*, 2008; Lamarque *et al*, 2005).

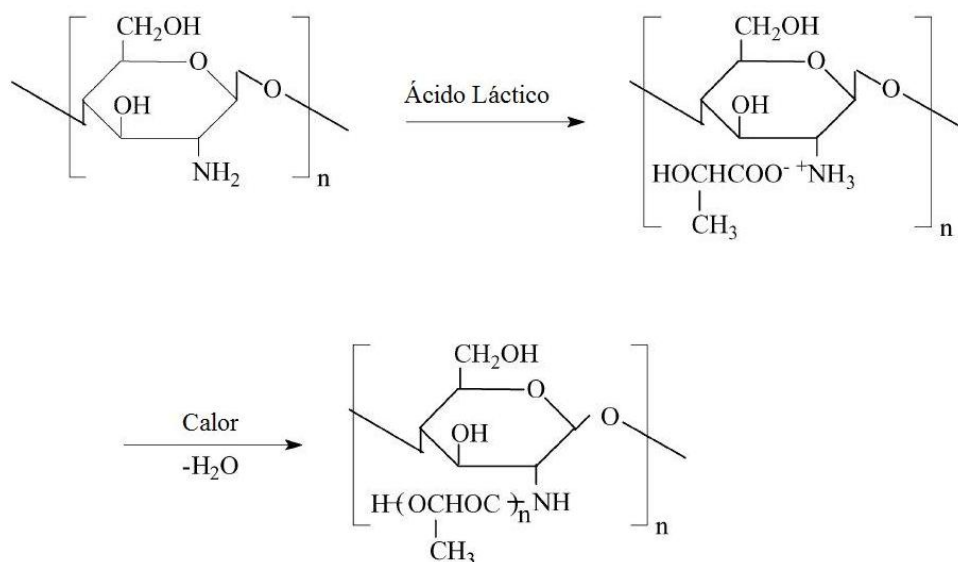
Mientras que los mayores % de solubles de los quitosanos en solución de ácido acético (0.1 M) fueron determinados en aquellos preparados en condiciones atmosféricas (L1 y L3), que al obtenido en  $N_2$ , ya que el porcentaje de solubles del quitosano está muy relacionado con el DA, y estos se producen por la protonación del grupo amino de la unidad de repetición D-Glucosamina. Sin embargo el porcentaje de solubles es un parámetro difícil de controlar porque se relaciona con más factores que involucran las propiedades del ácido y la conformación de la cadena de quitosano (Muzzarelli, 1973).

## 7.2 Síntesis y caracterización de los copolímeros.

### 7.2.1 Síntesis de quitosano-g-ácido láctico (QAL).

La síntesis de este material se realizó con dos diferentes quitosanos, con el primer quitosano (C1) se determinaron las condiciones de reacción y el mejor método de purificación. Después, estas condiciones de reacción y método de purificación se aplicaron en la síntesis de un segundo lote de QAL con quitosano L3 (Tabla 3).

En la Figura 6 se muestra el esquema de reacción; cuando el quitosano se disuelve en la solución de ácido láctico, el grupo amino es protonado y se forma la sal de lactato amino quitosano. Al calentar la solución se forman los grupos amida entre el quitosano y el ácido láctico por la deshidratación de la sal formada.



**Figura 6.** Copolimerización por injerto de quitosano y ácido láctico.

Debido a la dificultad de eliminar el agua en el sistema de reacción, en la etapa de deshidratación para la formación de la amida pueden existir en el producto preparado compuestos como ácido láctico y oligos de ácido láctico sin reaccionar. Por ello una vez



terminada la reacción se llevó a cabo la purificación, mediante la precipitación en un antidisolvente.

La acetona es un compuesto que puede disolver los monómeros y oligómeros sin reaccionar, así el copolímero puede separarse después de la extracción con acetona.

En la Tabla 4, se muestran los resultados del rendimiento obtenido con cada una de los procedimientos de purificación empleados y la incorporación de ácido láctico obtenido gravimétricamente. Se observa que los valores de rendimiento son bajos, sin embargo hay que considerar que no todo el ácido láctico reacciona.

**Tabla 4.** Rendimientos y porcentajes de incorporación obtenidos de cada una de los métodos de purificación.

<b>Método de purificación</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Incorporación de ácido láctico (%)</b>
<b>dA</b>	23.68 ±1.74	19.99 ±0.24
<b>dfA</b>	25.79 ±1.59	20.01 ±0.22
<b>dfAf</b>	40.05 ±4.54	20.04 ±0.42

Los resultados son promedios de tres determinaciones y sus desviaciones estándar.

dA: Purificación del copolímero por precipitación directa en acetona.

dfA: Purificación del copolímero por precipitación directa en frío con acetona.

dfaf: Purificación del copolímero por precipitación por goteo en acetona en frío.

Como se observa en la Tabla 4, se logró recuperar mayor cantidad de copolímero empleando la técnica de precipitación por goteo en frío, esto pudo deberse a que se mejoran las condiciones de supersaturación del soluto. Además, el cambio de recuperar el copolímero por centrifugación que por filtración disminuyó la pérdida debido a que por filtración parte de éste se quedaba adherido al filtro. Como se esperaba, los porcentajes de incorporación también aumentaron aunque en menor proporción que el rendimiento.

A los materiales obtenidos en las diferentes técnicas de purificación se les determino la relación molar entre el quitosano y el ácido láctico incorporado mediante espectrometría de  $^1\text{H}$ RMN considerando las áreas de las bandas características del ácido láctico y las áreas del quitosano.

La tabla 5 muestra los cálculos de relación molar y porcentaje de fracción molar. Se puede observar que la fracción molar de ácido láctico incorporado varió del 58 al 59%.

En promedio, la relación molar indica que por cada 7 unidades lactil hay 5 unidades glucosídicas de quitosano y la fracción molar indica que en promedio el 58% de la composición molecular es ácido láctico.

**Tabla 5.** Relación molar y porcentaje de fracción molar del copolímero quitosano-g-ácido láctico determinado por <sup>1</sup>H-RMN.

Método de Purificación	dA	dfA	dfAf
Relación molar	1.36 ±0.0022	1.44 ±0.0008	1.42 ±0.0006
Fracción molar (%)	57.73 ±0.0388	59.04 ±0.0164	58.84 ±0.0107

Los resultados son promedios de tres determinaciones y sus desviaciones estándar.

dA: Purificación del copolímero por precipitación directa en acetona.

dfA: Purificación del copolímero por precipitación directa en frío con acetona.

dfAf: Purificación del copolímero por precipitación por goteo en acetona en frío.

La purificación con estos métodos se realizó inmediatamente después de la reacción sin formar la película, Sin embargo la formación de la película con el copolímero purificado no fue posible, ya que no fue posible solubilizar el copolímero en soluciones diluidas de ácido ni en agua, lo que hizo difícil la formación de las películas, por lo que se retomó la purificación inicial con el Soxhlet por 12 h.

### 7.2.1.1 Condiciones de reacción para la policondensación.

En la síntesis de QAL se evaluaron las condiciones de tiempo de reacción y grado de acetilación de los quitosanos en el porcentaje de incorporación. Las condiciones de reacción como la temperatura y la relación de ácido láctico/quitosano, fueron fijadas conforme a lo encontrado en la literatura como las mejores (Qu *et al*, 1999; Yao *et al*, 2003; Li *et al*, 2008).

#### 7.2.1.1.1 Efecto del tiempo de reacción en el porcentaje de incorporación

La reacción se llevó a 80 °C, con una relación de Ácido láctico/quitosano = 2 (Qu *et al* 1999; Yao *et. al*, 2003) y los tiempos de reacción fueron de 1 a 4 h, se determinó el porcentaje de incorporación en peso (ecuación 9) y en relación de las áreas de los espectros FTIR (ecuación 12).

Los resultados se observan en la tabla 6, en donde a las 2 h de reacción se obtuvo un mayor porcentaje de incorporación seguido de la hora 3, 1 y 4, sin embargo al hacer las pruebas estadísticas se encontró que no había diferencia significativa (P<0.05) en las horas de reacción en cuanto al porcentaje de incorporación determinado por gravimetría.

Asimismo se presentan la incorporación por las relaciones de banda realizadas mediante el método de línea base de Duarte *et al* (2002), las bandas prueba (BP) fueron A<sub>1685-1772</sub> y A<sub>1437-1483</sub>, que corresponden al grupo C=O y al CH<sub>3</sub> del ácido láctico, dichas bandas características en el espectro del AL no se observan en el espectro del quitosano, pero si se observan en el espectro del copolímero, indicando la incorporación del AL a la estructura del quitosano como se muestra en la Figura 11 de las sección 7.2.6. La banda

de referencia (BR) ayuda a estandarizar los espectros a una línea base para poder comparar sus áreas y determinar cuál fue el mejor tiempo de reacción. La BR no debe variar con la incorporación de AL en el quitosano por lo cual al observar los espectros se determina como BR  $A_{1029}$  que es característica de la unión C-O que se relaciona con los grupos CHO, COC o  $CH_2OH$  del anillo.

**Tabla 6.** Porcentajes de incorporación a diferentes tiempos de reacción de policondensación de ácido láctico en quitosano.

Tiempo (h)	Incorporación* (%)	Incorporación*
1	18.498 <sup>a</sup>	6.403 <sup>b</sup>
2	20.221 <sup>a</sup>	7.053 <sup>a</sup>
3	20.009 <sup>a</sup>	5.124 <sup>d</sup>
4	17.809 <sup>a</sup>	5.821 <sup>c</sup>

Las unidades experimentales por cada hora fueron 3. Las letras diferentes indican grupos con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) de acuerdo a prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer. \* Determinado por gravimetría.  $^{\dagger}[(A_{1685-1772} + A_{1437-1483})/A_{1029}]$

Con base en los resultados (tabla 6) se determinó que el mejor tiempo de reacción fue de 2h, que es un mejor tiempo que lo reportado por Yao *et al*, (2003) quienes emplearon un tiempo total de 5 h para la formación del copolímero, en un sistema de reacción por policondensación sin catalizador. Por otro lado Li *et al*, (2008) encontraron que su mejor tiempo de reacción fue de 3h para la síntesis de materiales de quitosano y L-ácido láctico usando una ruta de protección-injerto-desprotección, para unir al PLA en el carbono seis del quitosano, no encontrando cambios relevantes en el % de incorporación después de este tiempo, y se mencionan que en sistemas diferentes con los mismos compuestos concuerdan con el tiempo de reacción para la síntesis.

#### 7.2.1.1.2 Efecto del grado de acetilación del quitosano en el porcentaje de incorporación.

En virtud de que la incorporación determinada por la relación de áreas fue más adecuada para establecer las condiciones de reacción, se empleó para la selección de quitosanos con base a su grado de acetilación que permitieran para obtener una mayor incorporación de ácido láctico. Los %DA considerados fueron %DA < 1, %DA de 1 a 10, %DA de 10 a 20 y %DA > 20; los quitosanos empleados se presentan en la tabla 7.

Al igual que en el caso anterior no hubo diferencia significativa entre los quitosanos con diferente DA en cuanto al porcentaje de incorporación medido por gravimetría, pero al realizar la comparación de áreas de las BP y BR se observó que el mejor quitosano fue aquel que estuvo un intervalo DA de 1 a 10, por lo que quitosano L3 con un 9.8% de DA fue seleccionado para trabajo posterior.

**Tabla 7.** Incorporación de AL con quitosanos con diferentes %DA mediante la reacción de policondensación.

DA (%)	DA de Quitosanos (%)	Incorporación* (%)	Incorporación <sup>+</sup>
DA<1	0.68	20.22 <sup>a</sup>	7.488 <sup>c</sup>
DA 1-10	4.98	20.01 <sup>a</sup>	9.289 <sup>a</sup>
DA 10-20	14	18.50 <sup>a</sup>	8.502 <sup>b</sup>
DA>20	22	17.81 <sup>a</sup>	4.442 <sup>d</sup>

Las unidades experimentales por cada DA fueron 3. Las letras diferentes indican grupos con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) de acuerdo a prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer. \*Determinado por gravimetría.  $^+ [(A_{1685-1772} + A_{1437-1483}) / A_{1029}]$

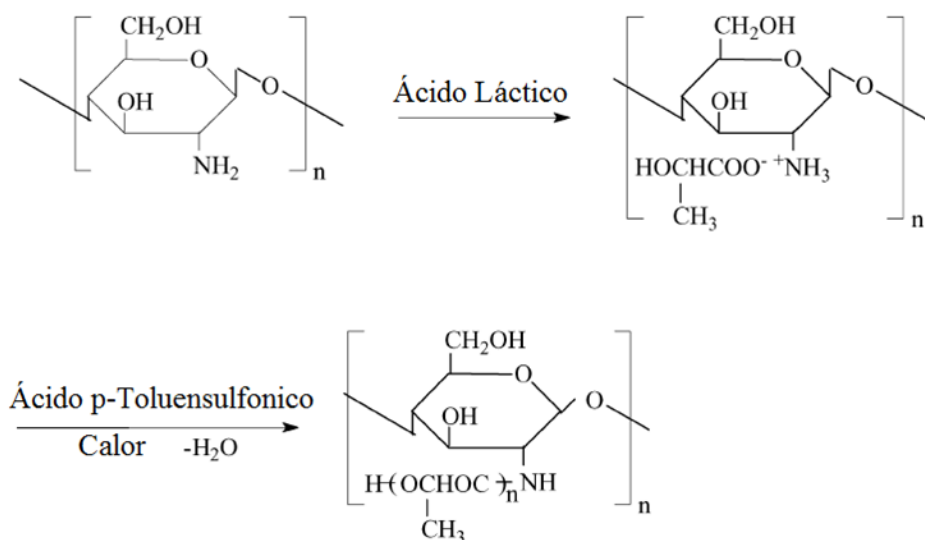
### 7.2.2 Síntesis de quitosano-g-poli (ácido láctico) (QPAL).

Al igual que en el material anterior, la síntesis de este material se realizó con dos diferentes quitosanos, con el primer quitosano (C1) se determinaron las condiciones de reacción y el mejor método de purificación. Después estas condiciones de reacción y método de purificación se aplicaron en la síntesis de un segundo lote de QPAL con quitosano L3.

En primera instancia se realizó la síntesis como lo reportó Suyatma *et al*, (2010), después a este sistema de reacción se le redujo un 30% de agua, ya que este autor se basó en el mismo sistema de reacción del material QAL, es decir, se preparó la misma solución de quitosano-ácido láctico bajo la mismas condiciones, pero para la síntesis se agregó más ácido hasta tener una relación de quitosano/ácido láctico = 0.2, el catalizador 10 % con respecto al monómero y la cantidad de agua necesaria para tener un volumen total de 300 mL. Sin embargo, el agua no era necesaria puesto que la formación del enlace amida se basa en una deshidratación de los reactantes y un exceso de agua promueve la hidrólisis del enlace y de la cadena de PLA, el esquema de reacción se observa en la Figura 7.

La purificación de QPAL se realizó con el mejor procedimiento descrito para QAL, durante la purificación basada en un sistema de disolvente/antidisolvente con acetona en frío se observó que la mezcla no precipitaba ni formaba sales, sino que se disgregaba y solo se veían pequeñas partículas suspendidas, por lo que una fracción de la solución se vació en un sistema con acetona a temperatura ambiente, observándose a los pocos minutos la formación de un hidrogel a diferencia de lo reportado por Suyatma *et al*, (2010).

Una porción de la solución del material preparado se vació en una caja de Petri para tratar de secar y formar una película, de acuerdo con el método de Qu *et al*, (1999) pero la mezcla no secó. Por lo que, para este material se usó el método de purificación directo con acetona. Se probaron dos métodos para recuperar el material puro, filtración o centrifugación.



**Figura 7.** Copolimerización de quitosano y ácido láctico por injerto.

En la Tabla 8 se muestran los resultados del rendimiento obtenido con cada una de las técnicas empleadas para la recuperación de los copolímeros. Se recuperó la mayor cantidad de copolímero empleando la centrifugación que por filtración debido a pérdidas del material en el filtro empleado.

**Tabla 8.** Rendimientos y porcentajes de incorporación de AL en quitosano mediante la reacción de policondensación con catalizador.

Método de recuperación	Rendimiento (%)	Incorporación de ácido láctico (%)
Filtración	17.34 ±0.00	17.66 ±0.00
Centrifugación	22.60 ±2.87	54.02 ±2.87

Los resultados son promedios de dos determinaciones y sus desviaciones estándar.

Para determinar la relación molar entre el quitosano y el ácido láctico que se incorporó durante la síntesis, se realizó el análisis de <sup>1</sup>H-RMN para el copolímero obtenido por centrifugación (Figura 16). La tabla 9 muestra las relaciones y fracciones molares. Esta relación molar indica que se tienen 6 unidades lactil por 9 unidades de repetición de quitosano, es por ello que la fracción molar es baja debido a que solo el 39% de la molécula es ácido láctico.

**Tabla 9.** Relación molar y porcentaje de fracción molar del copolímero quitosano-g-poliláctico.

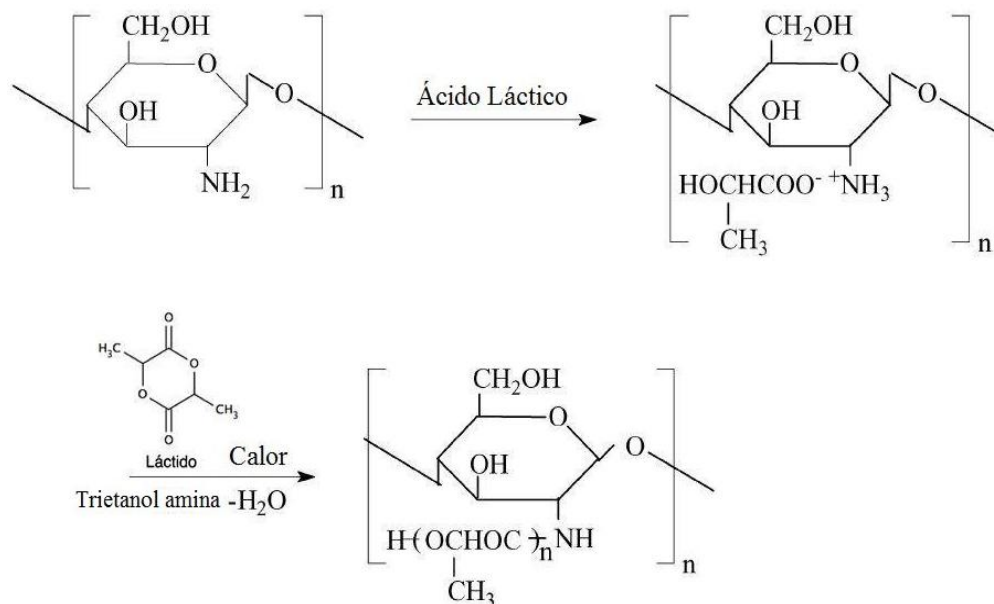
Material	Relación molar	Fracción molar (%)
Centrifugación	0.6604 ±0.005	39.77 ±0.19

Los resultados son promedios de dos determinaciones y sus desviaciones estándar.

La relación y fracción molar bajas indican que no hubo esterificación, es decir, la cadena de ácido láctico no polimerizó al parecer el catalizador no se activó, ya que en el sistema de reacción había una gran cantidad de agua por lo que no hubo efecto del agente esterificante o el en sistema de reacción hubo polimerización pero por el exceso de agua en el sistema enseguida se promovía la hidrólisis del polímero.

### 7.2.3 Síntesis de quitosano – poli (Láctido) (QPLA).

De la misma manera que el copolímero QAL, la síntesis de este material se realizó con dos diferentes quitosanos, con el primer quitosano (C1) se determinaron las condiciones de reacción y el mejor método de purificación. Después estas condiciones de reacción y método de purificación se aplicaron en la síntesis de un segundo lote de QPLA con el quitosano L3. La síntesis de este material se realizó conforme a lo reportado por Kim *et al*, (2002), las modificaciones que se hicieron a este método fueron: disolver el quitosano en ácido láctico, en lugar de ácido acético y eliminar el 30% de agua de la mezcla de reacción. El esquema de reacción se muestra en la Figura 8.



**Figura 8.** Mecanismo de reacción para la síntesis de quitosano-g-poliláctido.

Para la purificación del copolímero se siguió con el mismo sistema de disolvente/antisolvente usando acetona. Y se realizó centrifugación para separar el material puro. Una vez separado, el material fue hidratado (copolímero/agua=1) para la formación de la película.

En la Tabla 10, se muestran los resultados del rendimiento y la incorporación de ácido láctico obtenido gravimétricamente. Se observa que los valores de rendimiento fueron bajos, esto pudo deberse a que no polimerizó el láctido, aunque sí hubo injerto.

**Tabla 10.** Rendimientos y porcentajes de incorporación de AL en quitosano mediante la reacción de polimerización por apertura de anillo.

Copolímero	Rendimiento (%)	Incorporación de láctido (%)
QPLA	22.09 ±0.33	23.38 ±0.33

Los resultados son promedios de tres determinaciones y sus desviaciones estándar.

Se realizó el análisis de <sup>1</sup>H-RMN para QPLA obtenido con la finalidad de determinar la relación molar entre el quitosano y el láctido que se incorporó durante la síntesis (Figura 17). La tabla 11 muestra los cálculos de la relación y fracción molar.

**Tabla 11.** Relación molar y porcentaje de fracción molar del copolímero quitosano-g-poliláctido.

Copolímero	Relación molar	Fracción molar (%)
QPLA	0.16 ±0.002	13.48 ±0.13

Los resultados son promedios de tres determinaciones y sus desviaciones estándar.

La relación molar indica que por cada 4 moléculas de láctido tenemos 25 de quitosano aproximadamente, por lo que la fracción molar indica que el 13% de la molécula es láctido. Esto puede deberse a que en sistemas acuosos el láctido tiende a hidrolizarse (Avérous, 2008).

#### 7.2.4 Síntesis de los copolímeros QAL, QPAL Y QPLA pero con el quitosano L3.

El quitosano L3 obtenido (según las especificaciones de la sección 7.2.1.1.2) fue utilizado para la síntesis de los copolímeros utilizando las mejores condiciones de reacción y métodos de purificación encontrados para cada material. En resumen, fueron sintetizados los tres copolímeros QAL, QPAL y QPLA pero ahora con el quitosano L3.

En la tabla 12 se muestra los resultados del porcentaje de incorporación y rendimiento de los copolímeros del quitosano (L3). En la misma tabla, a modo de comparación, se

presenta los mejores resultados de incorporación de los copolímeros sintetizados con el quitosano C1.

**Tabla 12.** Rendimientos y porcentajes de incorporación de AL en los Quitosanos C1 y L3, en los diferentes copolímeros.

<b>Material</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Incorporación de ácido láctico (%)</b>
<b>Quitosano C1</b>		
<b>QAL (C1)</b>	40.05 ±4.54	20.04 ±0.42
<b>QPAL (C1)</b>	22.60 ±2.87	54.02 ±2.87
<b>QPLA (C1)</b>	22.09 ±0.33	23.38 ±0.33
<b>Quitosano L3</b>		
<b>QAL (L3)</b>	40.45 ±0.06	40.81 ±0.06
<b>QPAL (L3)</b>	23.85 ±0.21	57.10 ±0.21
<b>QPLA (L3)</b>	48.65 ±0.18	23.40 ±0.18

Los resultados son promedios de tres determinaciones y sus desviaciones estándar.

Comparando los copolímeros de QAL de ambos quitosanos en cuanto al rendimiento se recuperaron cantidades muy similares solo 0.4 % más con el quitosano L3, en cuanto a la incorporación con el segundo quitosano se obtuvo una mayor incorporación de ácido láctico de casi el doble esto podría deberse a que el método de purificación no fue el adecuado para remover todos los oligómeros o monómeros que no reaccionaron y están en la película QAL (L3), esto es confirmado por el % de fracción molar en la cual QAL (C1) tiene 18 unidades de porcentaje más de ácido láctico en su molécula que QAL (L3) (Tabla 13).

Al comparar los copolímeros QPAL en cuanto a rendimiento se obtuvo 1 % más con el quitosano (L3) que con el quitosano (C1), esto pudo deberse a que en el segundo material si se activó el catalizador puesto que en la relación molar se tiene que hay 3 unidades lactil por cada unidad de repetición del quitosano, tal vez hubo un crecimiento de cadena o una incorporación más homogénea, es decir en cada unidad de quitosano se le incorporo una unidad lactil. Esto es reflejado en la incorporación puesto que hay 3 unidades más que con el segundo quitosano medido en masa y se corroboró en la fracción molar en donde el copolímero QPAL (L3) tiene una composición del 75% de ácido láctico, mientras que QPAL (C1) es de 40% de ácido láctico (Tabla 13).



**Tabla 13.** Relación molar y porcentaje de fracción molar de los copolímeros determinados por  $^1\text{H-RMN}$ .

Material	Relación molar	Fracción molar (%)
<b>QAL (C1)</b>	1.42 $\pm$ 0.0006	58.84 $\pm$ 0.0107
<b>QPAL (C1)</b>	0.6604 $\pm$ 0.005	39.77 $\pm$ 0.19
<b>QPLA (C1)</b>	0.16 $\pm$ 0.002	13.48 $\pm$ 0.13
<b>QAL (L3)</b>	0.44 $\pm$ 0.005	30.63 $\pm$ 0.23
<b>QPAL (L3)</b>	3.05 $\pm$ 0.01	75.33 $\pm$ 0.07
<b>QPLA (L3)</b>	1.22 $\pm$ 0.010	55 $\pm$ 0.21

Los resultados son promedios de tres determinaciones y sus desviaciones estándar.

Por último, al comparar los materiales QPLA se encontró que el rendimiento de QPLA (L3) fue de hasta 2 veces lo de QPAL (C1), aunque en el porcentaje de incorporación prácticamente fue el mismo, sin embargo el porcentaje de incorporación gravimétrico no es muy exacto y lo refleja el porcentaje de fracción molar, en donde QPLA (L3) está compuesto de 55% de ácido láctico, mientras que QPLA (C1) solo tiene 13.48% de unidades de lactil.

### 7.2.5 Peso molecular y porcentaje de solubles en ácido 0.1M.

Las evidencias sobre tales uniones o enlaces de quitosano y el ácido láctico es el cambio en sus propiedades como la de solubilización en soluciones ácido diluidas y en el peso molecular (Suyatma *et al*, 2010).

En la Tabla 14 se muestran los valores del peso molecular de cada material del primero y segundo lote con los diferentes quitosanos, así como el porcentaje de solubles.

En el caso del lote 1 se parte de un quitosano (C1) con un peso inicial de  $400\,000\text{ g mol}^{-1}$ , los tres materiales tuvieron un aumento de peso siendo QPLA (C1) el que tuvo el mayor aumento de peso, esto debido a que no fue ácido láctico si no láctido lo que se unió al quitosano, aunque se unió poco como la relación molar y la fracción molar lo indicaron pero lo suficiente para aumentar el tamaño de peso; en segundo lugar QAL (C1) que como lo indicó la fracción molar, un 58% de la composición son unidades lactil de ahí el aumento de peso. El copolímero QPAL (C1) aumentó el  $M_v$  pero en menor grado lo que es consistente con el porcentaje de ácido láctico incorporado.

**Tabla 14.** Peso molecular y porciento de solubles de los dos lotes de materiales en ácido acético (0.1 M).

<b>Material</b>	<b>Mv (x10<sup>3</sup> g mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Solubles en ácido acético (0.1 M) (%)</b>
<b>Quit (C1)</b>	400	88
<b>QAL (C1)</b>	492	39.57 ±1.00
<b>QPAL (C1)</b>	462	50.42 ±1.34
<b>QPLA (C1)</b>	505	43.22 ±1.15
<b>Quit (L3)</b>	959	93.70 ±0.59
<b>QAL (L3)</b>	977	34.58 ±0.48
<b>QPAL (L3)</b>	1115	53.58 ±1.51
<b>QPLA (L3)</b>	1026	48.14 ±0.89

Los resultados son promedios de tres determinaciones y sus desviaciones estándar.

Por otro lado, los materiales del segundo lote que partieron de un quitosano (L3) con un peso de 959 000 g mol<sup>-1</sup> también aumentaron siendo QPAL el que más aumentó en M<sub>v</sub>, y es congruente a lo observado en la relación molar y fracción molar, en donde el 75% es ácido Láctico. El copolímero QPLA también aumento de peso pero no en manera proporcional a las unidades lactil incorporadas (Relación Molar 1.22), pues en este copolímero se incorporo más ácido láctico comparado con el copolímero QPLA (C1). Mientras que QAL al tener solo 30 % de ácido láctico incorporado el aumento de peso no fue tan evidente.

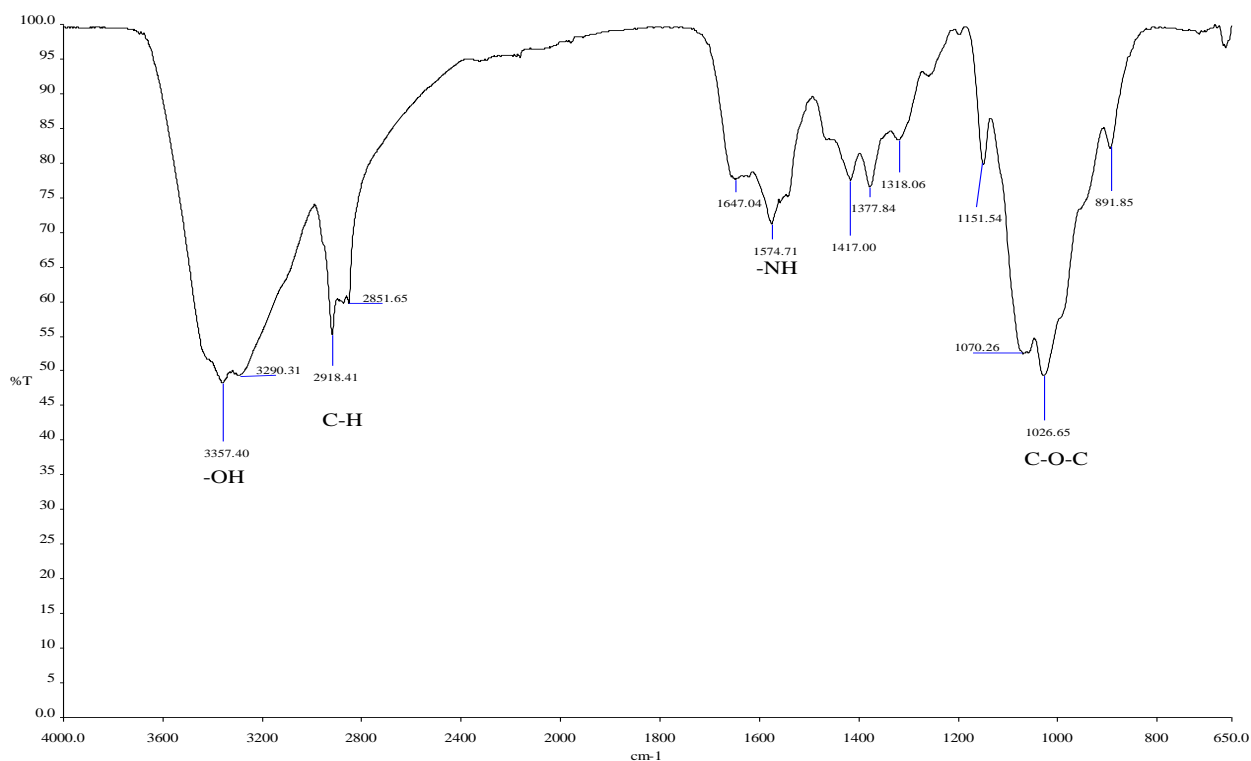
En cuanto a la solubilidad, en los dos lotes hay una disminución notable con respecto a la del quitosano, datos similares fueron reportados por Suyatma *et al*, (2010) quienes probaron los materiales en diferentes disolventes y en donde en cada uno los compuesto nativos fueron solubles encontrando que en la mayoría los copolímeros fueron insolubles. En este trabajo se determinó que los materiales disminuyeron hasta 3 veces su solubilidad en ácido láctico 0.1M que es el disolvente más utilizado para el quitosano nativo, esta disminución en la solubilidad es porque al formarse el enlace amida se genera un impedimento estérico por el PLA incorporado impidiendo la protonación del quitosano y por ello impidiendo la solubilidad del mismo, sin embargo quedan unidades de repetición de quitosano sin un injerto de PLA por lo que permiten que el copolímero tenga cierta solubilidad.

### 7.2.6 Análisis de IR de los copolímeros.

Después de la síntesis y la purificación, los copolímeros fueron analizados por la espectrometría de absorción en el infrarrojo medio, también se analizaron el quitosano

nativo, ácido láctico y los sobrenadantes. Utilizando la herramienta “compara” del programa “SPECTRUM” del ATR-FTIR se determinó que los espectros de los copolímeros del quitosano C1 y los espectros de los copolímeros del quitosano L3 son similares entre un 90 a 99%, por esta razón solo se muestran solo los espectros de los copolímeros a base del quitosano L3 como representativos. Los espectros de FTIR restantes se encuentran en el anexo A3.

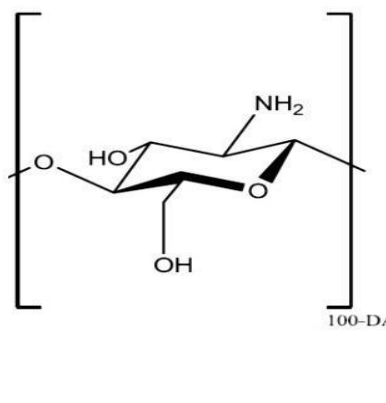
En las figuras 9 y 10 se muestran los espectros de infrarrojo medio del quitosano y del ácido láctico. En el espectro del quitosano nativo se observan las bandas representativas de los grupos funcionales que se resumen en la Tabla 15.

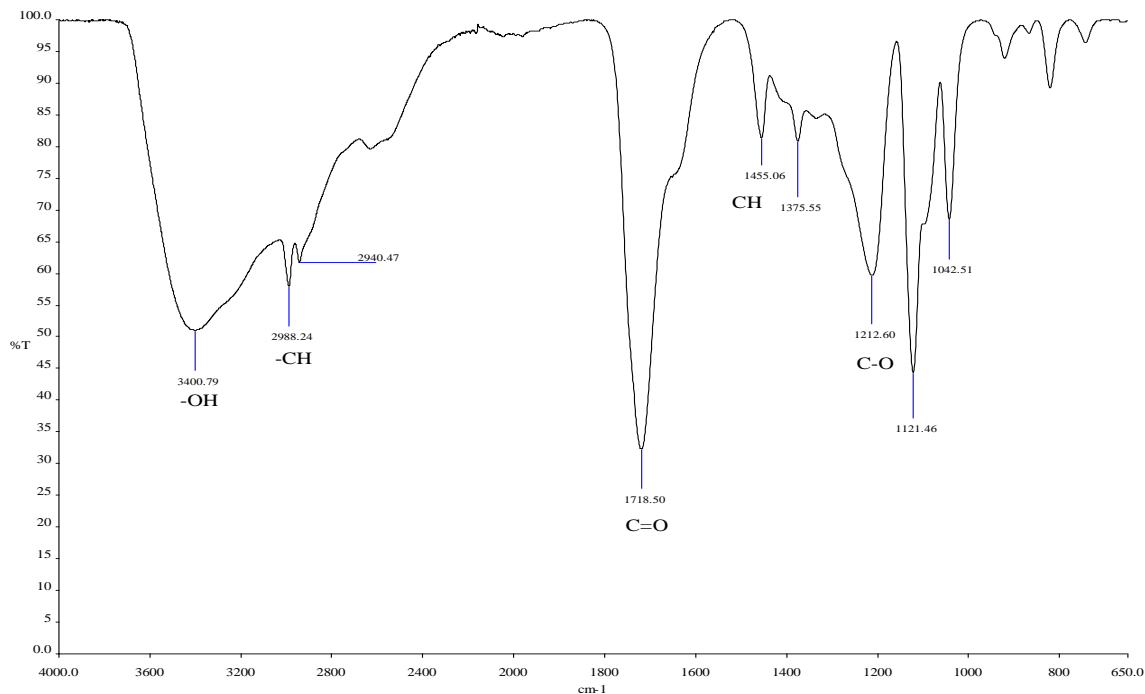


**Figura 9.** Espectro de infrarrojo medio del quitosano nativo.

Se observan las bandas características en:  $3357.4 \text{ cm}^{-1}$  correspondientes a los grupos OH del polímero, en  $2918.4$  y  $2851.6 \text{ cm}^{-1}$  del grupo -CH, en  $1647.0 \text{ cm}^{-1}$  del grupo -NH de una amida primaria asociada con los restos del grupo acetamida después de la desacetilación, en  $1574.7 \text{ cm}^{-1}$  aparece el grupo amino  $\text{-NH}_2$ , las vibraciones del esqueleto propias de la estructura de quitosano aparecen en  $1026.65$ . Esta última, se utiliza como banda de referencia para el método de la línea base (Duarte *et al*, 2002) por no cambiar durante la incorporación.

**Tabla 15.** Bandas características de los grupos funcionales del espectro de quitosano.

Frecuencia ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupo funcional	Estructura del quitosano
3357.40	Grupos $-\text{OH}$ del polímero	
3290.31	Grupo N-H	
2918.41 y 2851.65	Grupo C-H	
1647.04	Grupo $-\text{NH}$ de una amina primaria	
1574.71	Grupo $-\text{NH}_2$	
1417.00	Grupo $-\text{CH}_2$	
1377.84	$-\text{CH}_3$ y $\text{C}-\text{CH}_3$	
1318.06	Amida terciaria	
1151.54	Tensión asimétrica del grupo C-O-C	
1070.26 y 1026.65	Vibraciones del esqueleto de los grupo C-O, C-O-C.	
891.85	C-H de los grupos anoméricos	



**Figura 10.** Espectro de infrarrojo medio de ácido láctico (AL).

En el espectro de AL nativo se observan las bandas representativas de los grupos funcionales que se resumen en la Tabla A1.1 del anexo A3. Las señales características para el ácido láctico son:  $1718.5 \text{ cm}^{-1}$  estiramiento del  $\text{C}=\text{O}$ ,  $1455.06$  y  $1375.5 \text{ cm}^{-1}$  flexiones simétricas de los grupos CH y  $\text{CH}_3$ ,  $1212.6$  y  $1121.2 \text{ cm}^{-1}$  estiramientos de  $-\text{C}-\text{O}-$  del grupo ácido y éster (Figura 10). Las bandas de estiramiento y flexiones simétricas sirven como bandas de prueba para determinar la incorporación (Duarte *et al*, 2002).

La Figura 11 muestra los espectros IR de quitosano (L3) y quitosano-ácido láctico después de purificado (QAL). El espectro de IR de L3 muestra bandas asignadas a la piranosa en 1070.2 y 1026.6  $\text{cm}^{-1}$  y una fuerte banda del grupo amino característica en torno a 1574.1  $\text{cm}^{-1}$ .

La banda de 1674  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye a la banda amida I de N-acilado quitosano. En comparación con el espectro IR del quitosano, el copolímero (QAL) tiene una nueva banda que aparece alrededor de los 1738  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente al éster o grupos carboxílicos del ácido láctico existente como libres o de cadena lateral.

La banda de absorción alrededor de 1581.7  $\text{cm}^{-1}$  es un resultado de la superposición de los picos de las bandas de amida I y los grupos amino de L3. El cambio de la absorción del grupo amino de 1574.7  $\text{cm}^{-1}$  del quitosano (L3) a 1581.7  $\text{cm}^{-1}$  del copolímero QAL implica que AL está ligado con el quitosano, a través de enlaces amida o la estática interacción de electrones, situación similar reportan Qu *et al*, (1999).

Después de la purificación del copolímero quitosano-g-poli (ácido láctico) (QPAL) se obtuvo su espectro IR como se muestra en la Figura. 11. En comparación con QAL, este copolímero es más parecido al ácido láctico, observándose las bandas características como estiramiento del C=O a 1720.9  $\text{cm}^{-1}$ , flexiones simétricas de los grupos CH a 1453.8  $\text{cm}^{-1}$ , estiramientos de -C-O- del grupo ácido y éster a 1212 y 1121  $\text{cm}^{-1}$ . También se observan las bandas características de quitosano antes mencionadas. En comparación con QAL, la banda a 1621  $\text{cm}^{-1}$  asignado a los grupos amida se hizo más fuerte en comparación con la banda a 1517  $\text{cm}^{-1}$  atribuidos a los grupos amino. Esto demuestra la formación del enlace amida entre quitosano y el ácido láctico, esto mismo fue encontrado por Yao *et al*, (2003).

En la misma figura se presenta el copolímero de quitosano-poli (láctido) (QPLA) Comparados con los copolímeros anteriores se determina que es muy similar a QAL, en el cual se observan las dos nuevas bandas a 1725.5 y 1454.7  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al grupo cetona del carboxilo y a las flexiones simétricas de CH del ácido láctico. Al igual que en QAL se observa un ensanchamiento de la banda del grupo amino y una disminución del número de onda, indicando la unión del láctido al quitosano.

Haciendo una analogía con el programa Spectrum del ATR-FTIR entre los copolímeros QPLA y QAL (Figura 11) se encontró que son similares en un 98%. Esto es de acuerdo a lo reportado por Li *et al*, (2011), el cual usó un catalizador diferente y partió de poli ácido láctico en el que obtuvo el copolímero pero con un bajo grado de injerto (relación molar 1 molécula de PLA por 9 de quitosano, en un grado de injerto de 6.87%  $\pm$ 0.01).

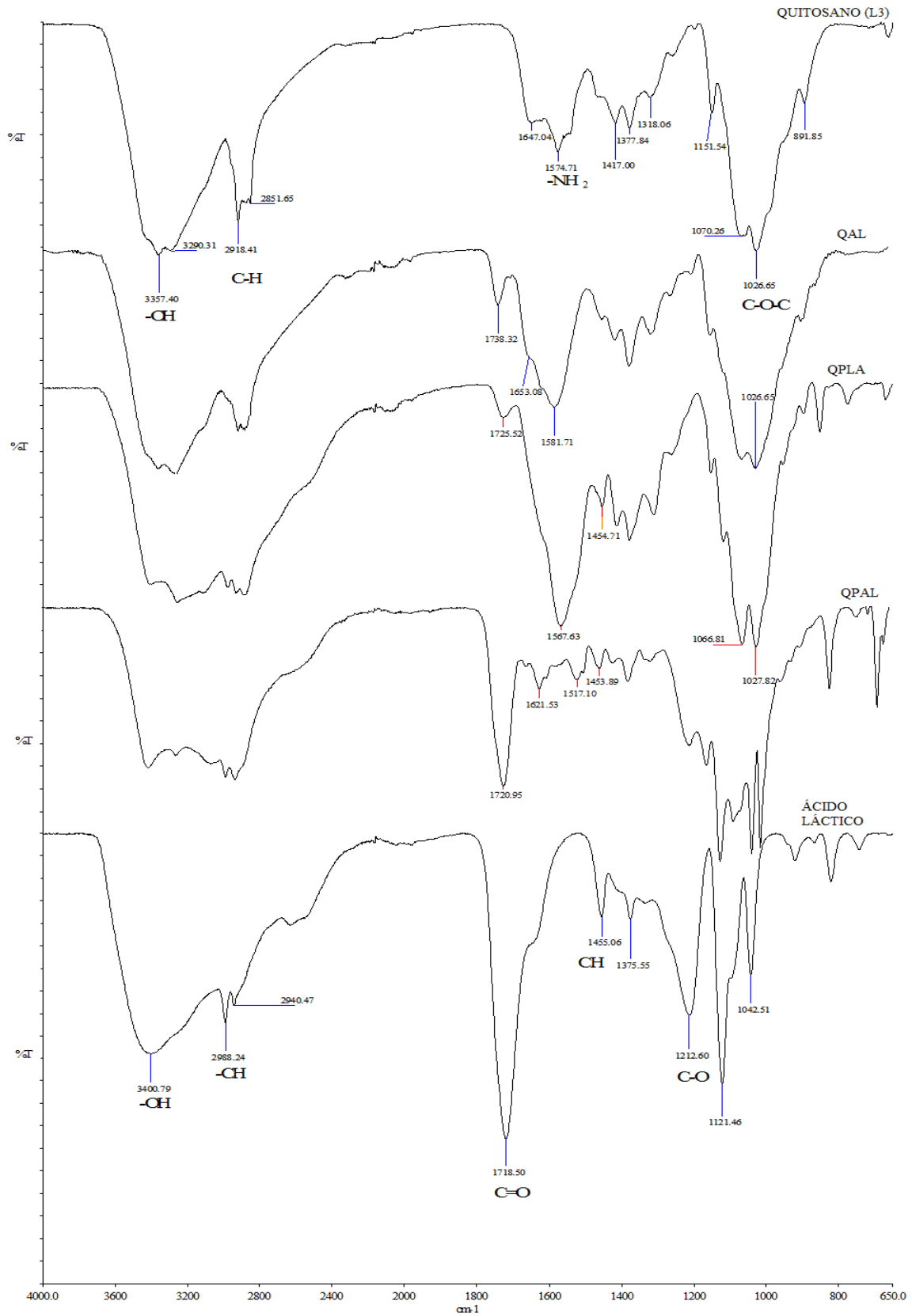
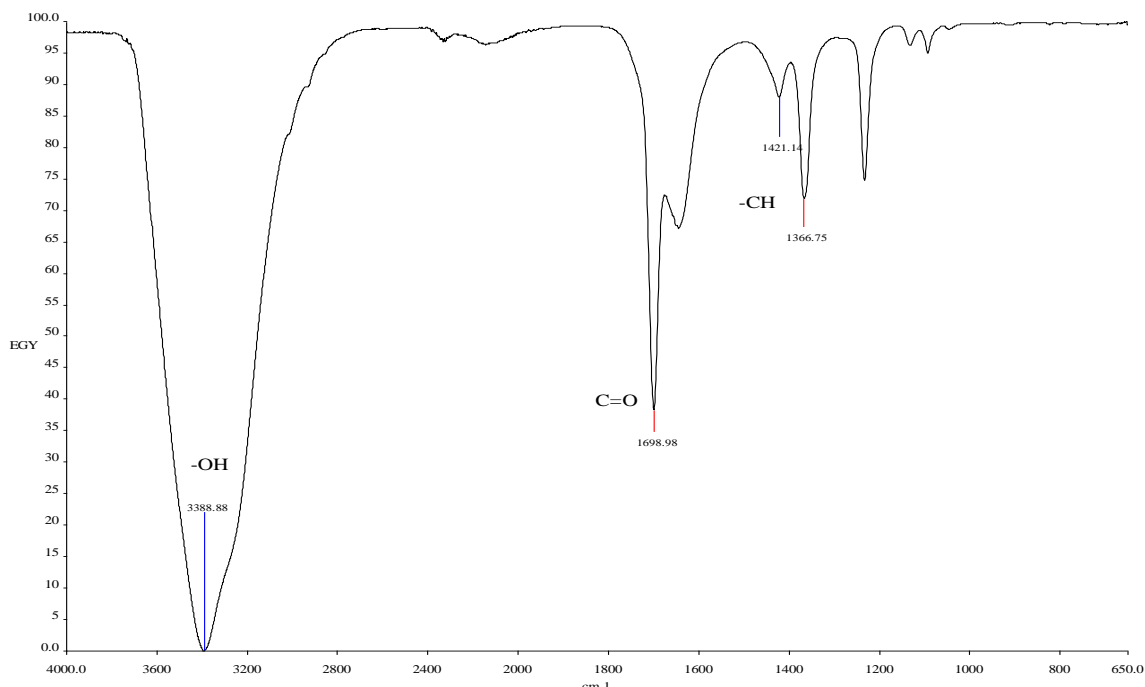


Figura 11. Espectro de infrarrojo de quitosano (L3), AL, QAL, QPAL y QPLA.



**Figura 12.** Espectro de infrarrojo medio de todos los sobrenadantes después de la extracción con acetona.

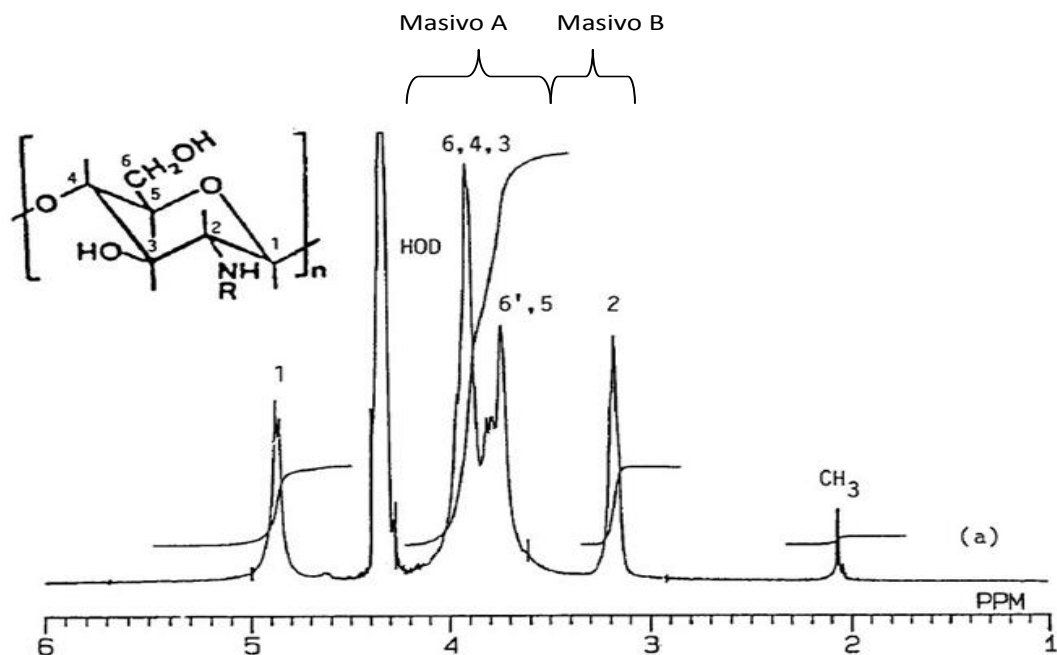
Por último, después de la purificación de los copolímeros con acetona, a las soluciones se le extrajo la acetona con un rotavapor, obteniéndose un líquido espeso color amarillo en todos los casos. Al comparar cada uno de los espectros de IR de los sobrenadantes con el espectro de IR de ácido láctico se observó que son casi los mismos por lo que solo se presenta el espectro de uno de ellos como representativo de todos en la Figura 12, los demás se encuentran en el anexo A3. Así que en general las extracciones de todos los polímeros estaban compuestas principalmente de ácido láctico.

### 7.2.7 Análisis de $^1\text{H}$ -RMN de los copolímeros.

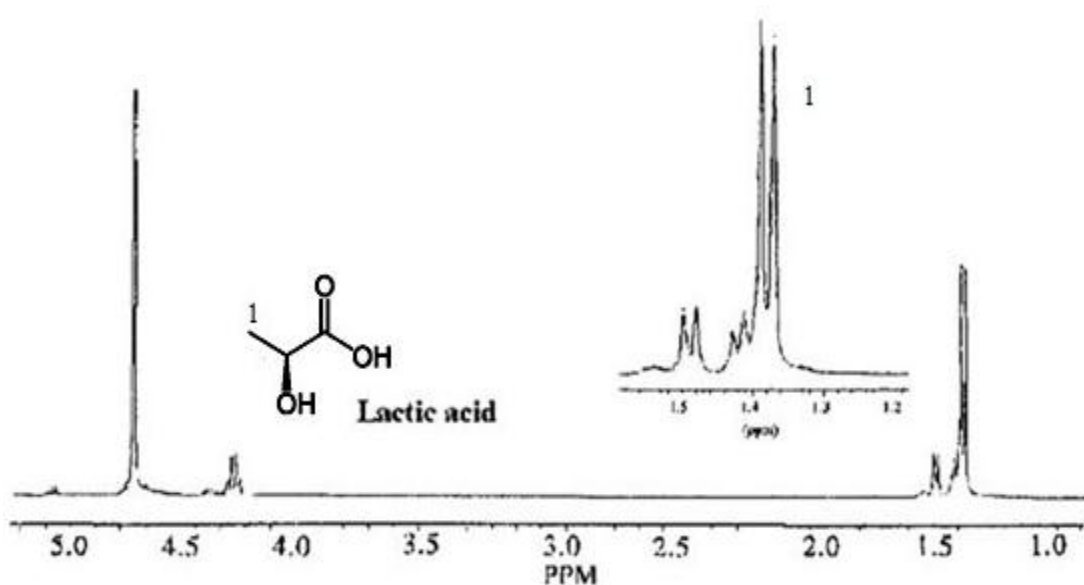
El análisis de RMN de los copolímeros se realizó para determinar la relación molar (RM) y el porcentaje de fracción molar (%FM) basado en el método del Hirai *et al*, (1991). Para este análisis se deben identificar las bandas del quitosano y las del ácido láctico, por lo que en la Figura 13 y 14 se muestran los espectros de RMN- $^1\text{H}$  del quitosano y el ácido láctico nativos.

En la figura 13 se observa que alrededor de 2 ppm aparece la primera banda correspondiente a los metilos del N-acilado quitosano, entre 3-3.4 ppm aparece el masivo B, que corresponde a los  $^1\text{H}$  relacionados con los C 2 y por ultimo de 3.5-4.2 ppm aparece el masivo A que corresponde a los  $^1\text{H}$  relacionados con los C 3-6 de la molécula. El masivo A y B son las bandas importantes para el cálculo de la RM y %FM.

Aparte en la figura 14 se observa que la banda principal de  $^1\text{H}$  relacionados al carbono metílico del ácido láctico aparecen de 1.3-1.4 ppm, que es la banda importante para el cálculo de relación molar y porcentaje de fracción molar.



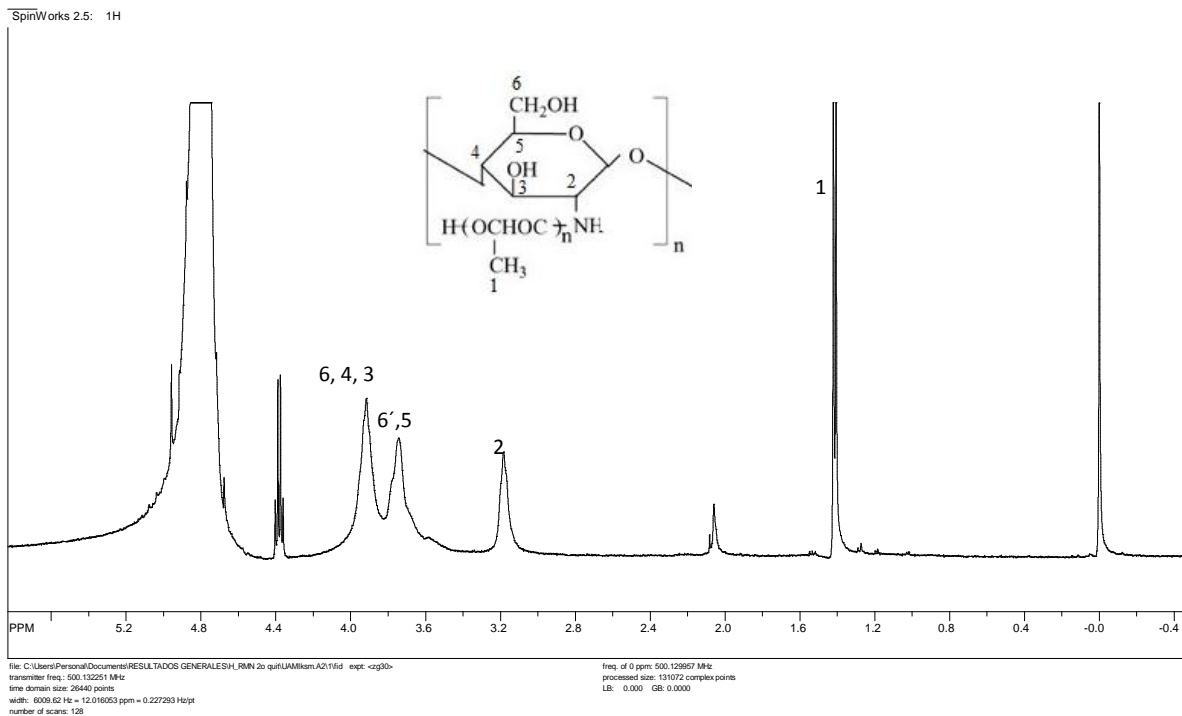
**Figura 13.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H a 400 MHz de quitosano en medio ácido de acuerdo a Hirai et al, (1991).



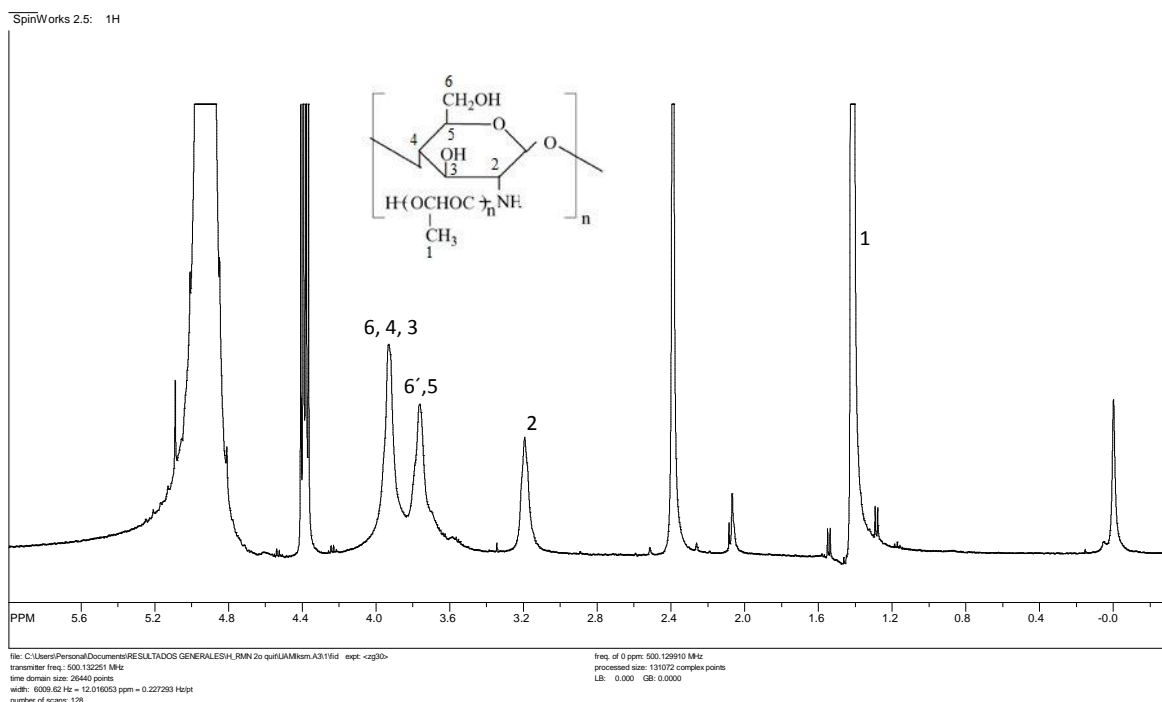
**Figura 14.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H a 400MHz de ácido láctico en D<sub>2</sub>O de acuerdo a Qu *et al*, (1999).

Una vez determinadas las bandas características de los compuestos nativos, se analizaron los espectros de los copolímeros QAL, QPAL y QPLA en las Figuras 15,16 y 17. En este análisis se muestran los espectros más representativos de cada polímero, los demás espectros se encuentran en el anexo A2.



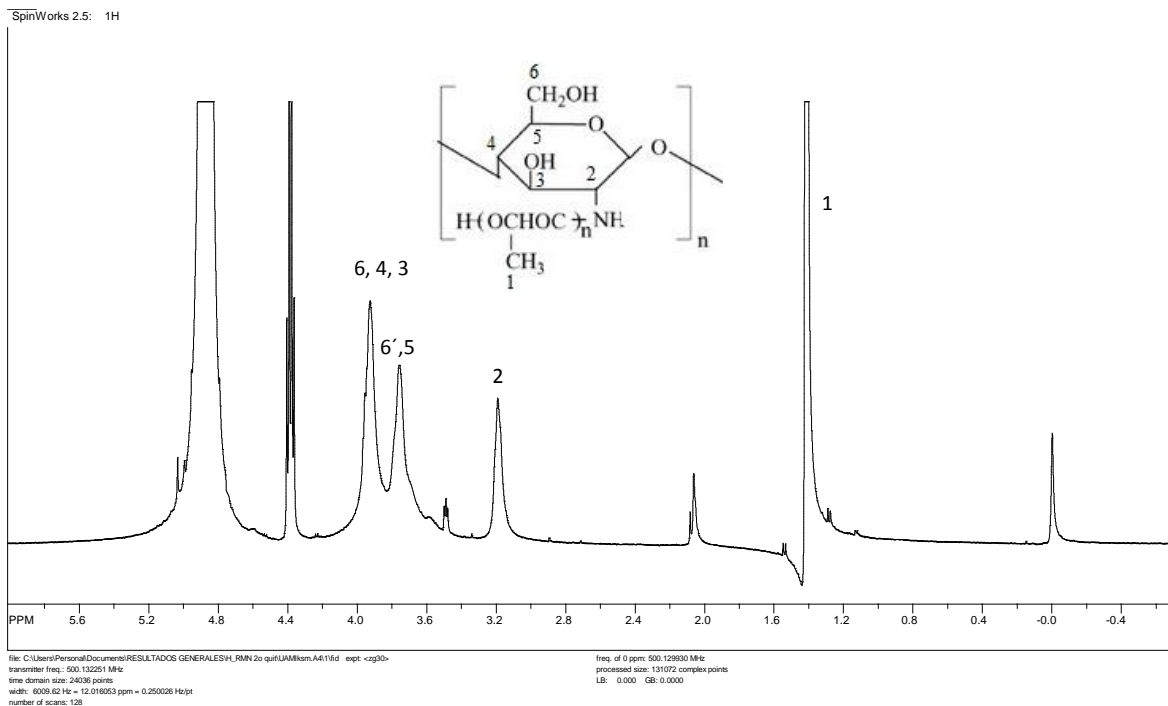


**Figura 15.** Espectro de RMN-1H a 400MHz de QAL en medio ácido.



**Figura 16.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H a 400MHz de QPAL en medio ácido.

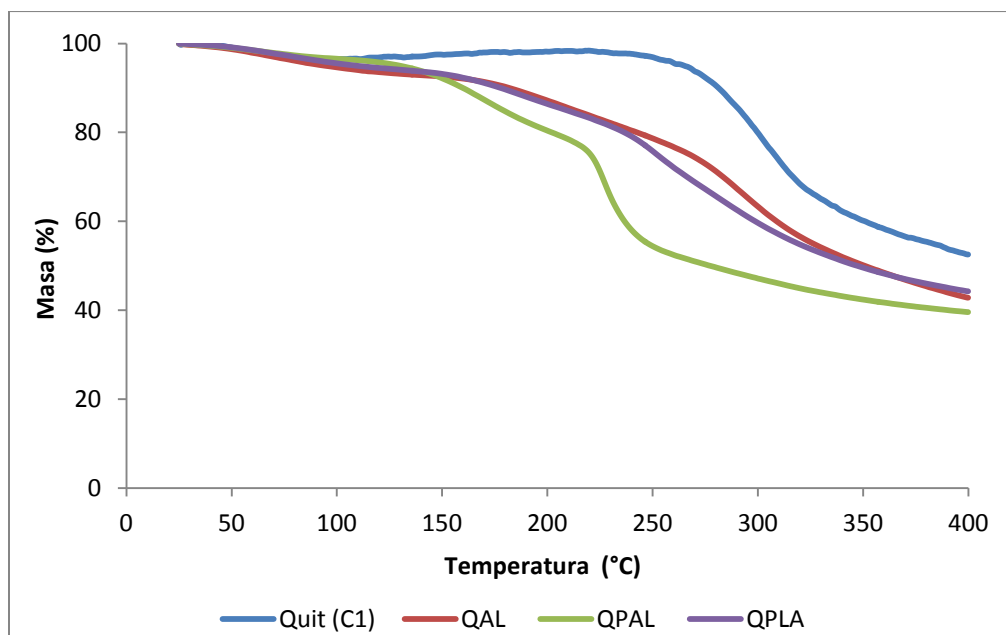
En las figuras de la 15-17 de los copolímeros se observa que están los masivos A y B del quitosano, así como los metilos del ácido láctico, corroborando la unión entre el ácido láctico y el quitosano. Mientras que los datos de RM y %FM fueron reportados en las secciones pertenecientes a la síntesis de cada uno de los copolímeros.



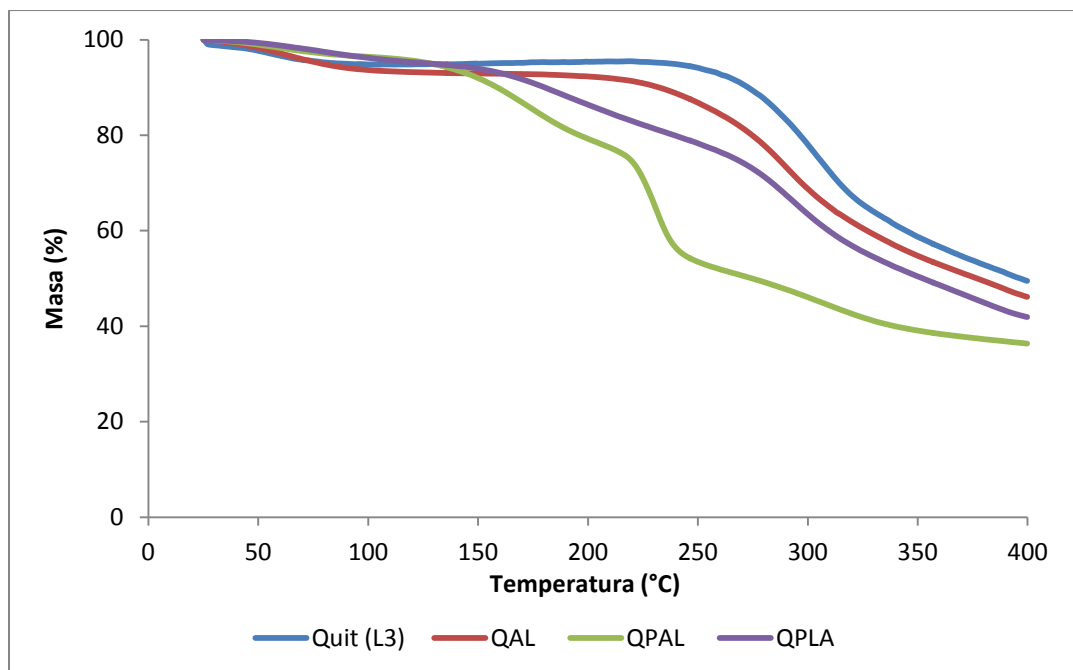
**Figura 17.** Espectro de RMN-1H a 400MHz de QPLA en medio ácido.

### 7.2.8 Análisis de estabilidad térmica

Los análisis termogravimétricos (TG) se basan en la variación de la masa en función de la temperatura. Los termogramas de los quitosano nativos y de los diferentes copolímeros se muestran en la Figura 18 y 19.



**Figura 18.** Termogramas de quitosano (C1), QAL, QPAL y QPLA del primer lote.

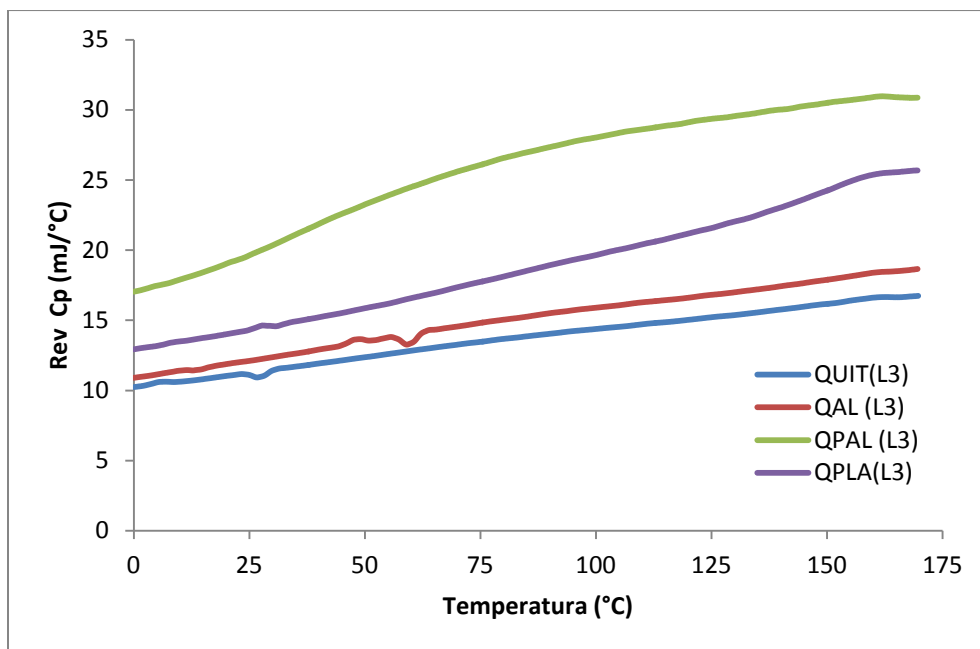


**Figura 19.** Termogramas de quitosano (L3), QAL, QPAL y QPLA del segundo lote.

En ambas figuras se observa que tanto en el quitosano C1 como el quitosano L3 ocurre la máxima pérdida de peso alrededor de los 300°C, que puede ser por una degradación aleatoria de cadenas principales de quitosano (ruptura de enlaces C-O-C), además de la separación de grupos acetilo (Hassan *et al*, 2012). Mientras que los compuestos que tuvieron un bajo nivel de incorporación, como QAL y QPLA (L3) del segundo lote de materiales muestran una tendencia muy similar en la pérdida de masa a la del quitosano original (Figura 19). Al comparar QAL y QPLA (L3) con los copolímeros QAL y QPLA (C1) se observa que los segundos son menos estables térmicamente pues inician con la pérdida de peso alrededor de los 150°C y ésta va siendo gradual hasta los 300 °C, debido a una mayor incorporación de ácido láctico.

Sin embargo los compuestos QPAL de ambos quitosanos, que presentaron una mayor incorporación de unidades de ácido láctico en la cadena de quitosano, tienen una pérdida de peso notable entre los 130 y 200 °C debido al ácido láctico (Estupiñán *et al*, 2007): siendo entre los 200 y 260 °C en donde presentan la máxima pérdida atribuida a la degradación del PLA (Avérous, 2008) y alrededor de los 300°C una tercera pérdida de peso correspondiente a la degradación del quitosano (Figuras 18 y 19). En ambos materiales se observa un cambio notable en la termoestabilidad del quitosano por lo que se corrobora el injerto del PLA en el quitosano.

En cuanto al ensayo de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) realizado a los polímeros, con el cual se miden las diferencias en la cantidad de calor aportado a una sustancia y a una referencia, en función de la temperatura de la muestra, registrándose las diferencias de en la cantidad de calor.



**Figura 20.** Análisis de DSC del quitosano (QUIT), QAL, QPAL Y QPLA de los materiales del quitosano L3.

En la Figura 20 se observan únicamente los perfiles de DSC de los polímeros del quitosano L3, en el perfil del quitosano se percibe un mínimo alrededor de los 26°C que es indicativo de una reacción endotérmica que se debe a una reacción de descomposición y no de fusión, ya que en el termograma de TG (Figura 19) no se muestran cambios de estado (escalones), por lo que se infiere que es una descomposición de oligómeros de quitosano atrapados en la estructura cristalina del quitosano. Comparando el termograma del quitosano con el del copolímero QAL, el endoterma de los 26°C no aparece, sin embargo a los 58°C aparece una nueva endoterma que es una  $T_g$  del PLA, que es acorde con lo reportado por Suyatma *et al*, (2010), y se confirma en el termograma de TG donde se da un cambio de estado a esa temperatura, por este resultado y el de cristalografía se intuye que se tiene un copolímero ramificado de cadena lateral sencilla (copolímero de injerto) en donde la cadena principal es de quitosano y las cadenas laterales están formadas por PLA, pero se tiene un bajo nivel de incorporación de PLA en el quitosano, es decir, que no en todas las moléculas de quitosano hay moléculas de PLA unidas y es congruente a los resultados de la relación molar.

Por otro lado, al compara con el compuesto QPLA éste tiene un perfil más parecido al del quitosano original y debido a que no presenta ninguna  $T_g$  antes de su punto de fusión que se encuentra aproximadamente a los 180 °C es por ello que se observa un cambio en la pendiente de la curva y que se confirma en el termograma TG en donde hay un cambio de estado ligero alrededor de esa temperatura (Figura 20). Este resultado es evidencia que se tiene un copolímero ramificado de cadena lateral sencilla (copolímero de injerto), al igual que el material anterior la cadena principal es quitosano, sin embargo por la relación molar y la intensidad de las bandas en el espectro de IR, se tienen más moléculas de PLA

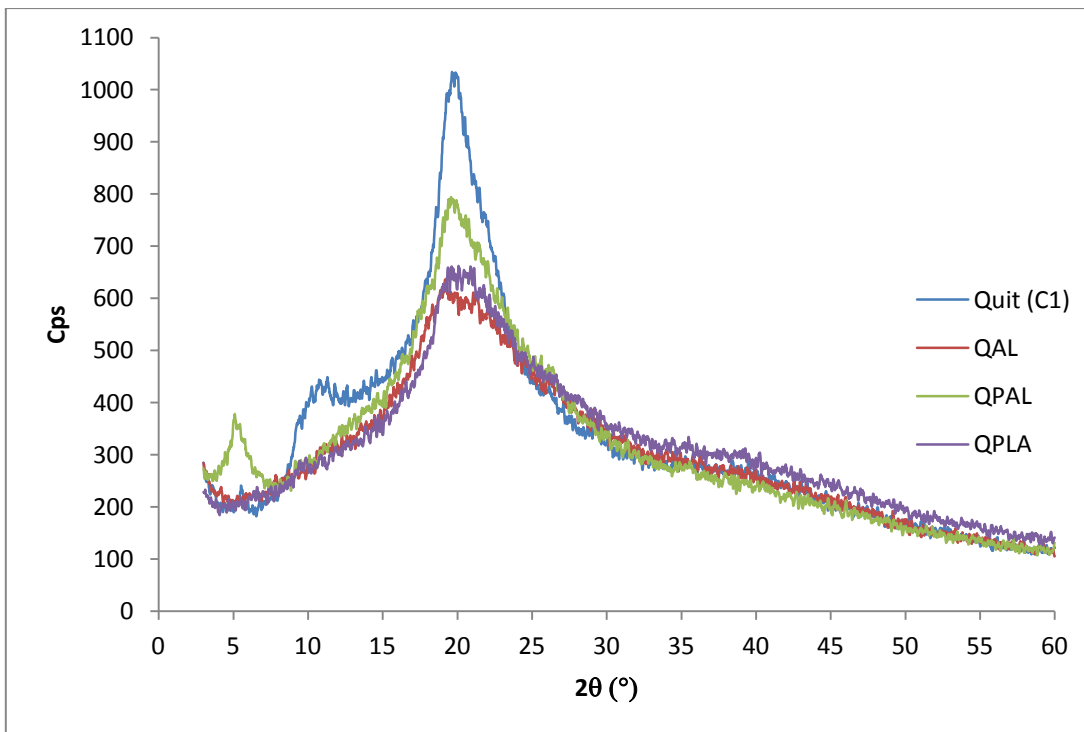
unidas al quitosano en contraste con el material anterior pero de menor tamaño, debido a que el copolímero adquiere una conformación cristalina que lo hace más termoestable.

Por último el compuesto QPAL no presenta ningún punto importante pero exhibió un termograma de DSC muy característico, el cual aunado a los resultados obtenidos en su termograma de TG, la relación molar que tiene y que es amorfo, sugiere que se tiene un copolímero ramificado en forma de peine, el cual se ordena apilando sus cadenas por interacciones hidrofóbicas formando zonas con una estructura pseudo-cristalina, razón por la cual no tiene puntos térmicos importantes, pues al estar interactuando las cadenas entre sí, lo hacen más termoestable.

### 7.2.9 Análisis de rayos X

Los perfiles de difracción de rayos X de los quitosanos y de los copolímeros se observan en la figura 21 y 22. El quitosano tiene una celda unitaria ortorrómbica con picos que aparecen alrededor de  $2\theta$  igual a 10 y 20 grados. Mientras que el PLA cristaliza en una celda unitaria pseudo-ortorrómbica, cuáles contienen  $2 \times 10^3$  hélices (en forma  $\alpha$ ), los principales picos en el perfil de difracción de rayos X aparecen a  $2\theta$  igual a 15, 17 y 19.

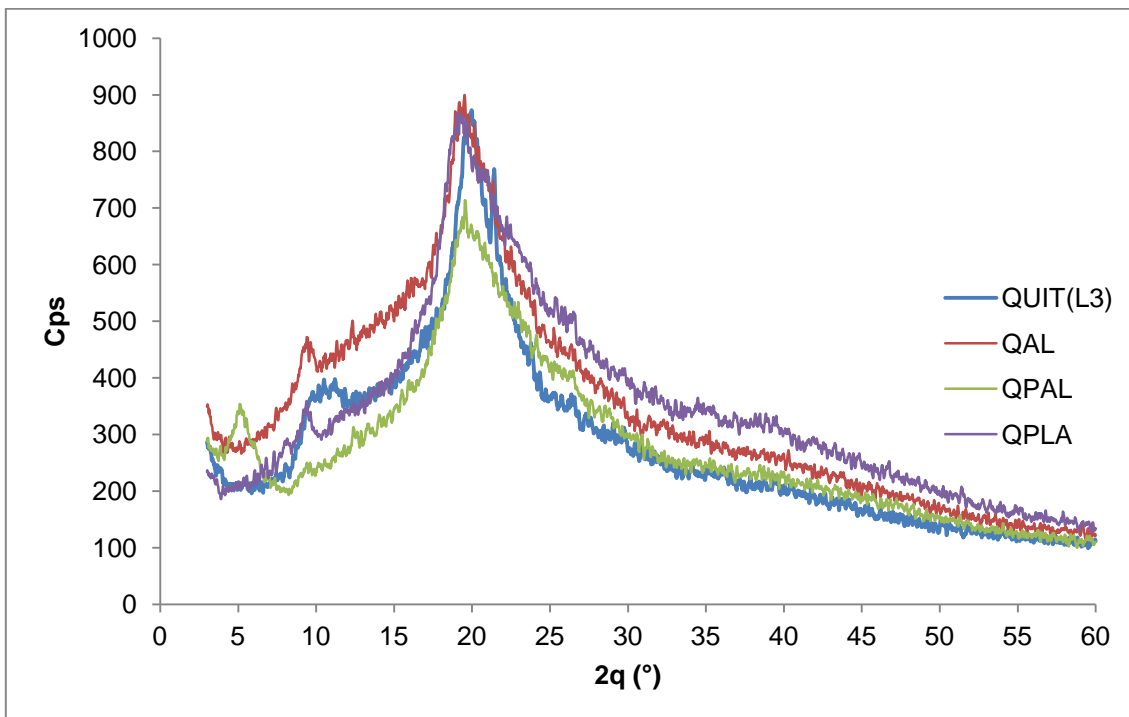
En comparación con quitosano y PLA, el injerto disminuye la intensidad del pico a  $2\theta=20^\circ$  y desaparece el pico a  $2\theta=10^\circ$ . Los primeros copolímeros con el quitosano C1 se hicieron casi amorfos al momento del injerto de los materiales polymerizados observándose una disminución en el  $I_{CR}$  y en el tamaño aparente del cristal ( $D_{ap}$ ) (Tabla 16).



**Figura 21.** Perfil de difracción de rayos X del quitosano (C1), QAL, QPAL y QPLA.

Dado que el ácido láctico reacciona con quitosano en una solución homogénea, el injerto por PLA tendrá lugar al azar a lo largo de la cadena, dando lugar a un copolímero al azar. Esto destruirá la regularidad del empaquetamiento de las cadenas originales de quitosano, lo que resulta en la formación de un copolímero casi amorfo, como se observa para QAL disminuyendo un 27% su  $I_{CR}$  y un 70 % su  $D_{ap}$ , esto mismo fue encontrado por Yao *et al.*, 2003 en una relaciones de alimentación de A. Láctico/quitosano iguales a 1. Mientras que para QPAL y QPLA el pico del quitosano ( $2\theta=20$ ) no disminuye tanto como los materiales anteriores debido a la baja incorporación de PLA, lo que hace que no se pierda la estructura cristalina del quitosano y se refleja en una disminución del  $I_{CR}$  en un 13% y un 38% en su  $D_{ap}$ .

Por el contrario, cuando el porcentaje de incorporación aumentó aún más, las cadenas laterales de PLLA se ensamblaron entre sí, y se observó un ensanchamiento del pico de  $2\theta$  en los perfiles de difracción de rayos X de QAL y QPLA de los segundos copolímeros, debido a que se superpone el pico en  $2\theta=19^\circ$  del PLA con el pico del quitosano en  $2\theta=20^\circ$  que se atribuyen a la cristalización de PLLA, y sin la desaparición del pico  $2\theta = 10^\circ$ . Yao *et al.*, 2003 reportaron algo similar, sin embargo en la relación que utilizaron de A. Láctico/quitosano igual a 5 hubo una disminución notable en el pico de  $2\theta=20^\circ$ , además de aparecer en los perfiles de difracción de rayos X los picos a  $2\theta$  igual a 15 y 17. Por otro lado QPAL en este lote de materiales se comportó de manera muy similar al del primer lote sin embargo ahora es mas amorfo que los dos primeros copolímeros esto por una mayor disminución en el pico de  $2\theta=10^\circ$ , pico característico de las quitinas.



**Figura 22.** Perfil de difracción de rayos X de quitosano (L3), QAL, QPAL y QPLA.

**Tabla 16.** Índice de cristalinidad ( $I_{CR}$ ) y tamaño aparente del cristal ( $D_{ap}$ ) de los quitosanos nativos y de los copolímeros.

Muestra	$I_{CR}$ (%)	$D_{ap}$
Quit (C1)	69.90	0.70
QAL (C1)	51.00	0.21
QPAL (C1)	60.89	0.47
QPLA(C1)	60.49	0.43
QUIT (L3)	70.92	0.87
QAL (L3)	61.40	0.71
QPAL (L3)	70.08	0.76
QPLA (L3)	69.66	0.44

El  $I_{CR}$  para estos compuestos disminuye al igual que los anteriores debido al injerto de PLA, pero siendo más notable en QAL esto debido a que el injerto fue bajo y más heterogéneo, es decir dejando grupos amino libre lo que permite que conserve ciertas regiones cristalinas homologas al quitosano nativo, es por ello que su  $D_{ap}$  solo disminuye un 18%. El copolímero QPAL solo disminuye un 0.17% su  $I_{CR}$  esto debido al a un mayor injerto de PLA y más homogéneo, comparado con QAL, lo que permite tal vez la formación de regiones cristalinas de PLA es por ello que su  $D_{ap}$  solo disminuyo un 12%. En contraste con lo que sucede con QPLA que su  $D_{ap}$  disminuye un 49% aunque su  $I_{CR}$  solo disminuye un 2% esto se podría deber al arreglo de la cadenas lo que permite seguir conservando zonas cristalinas pero de menor tamaño.

### 7.2.10 Pruebas mecánicas

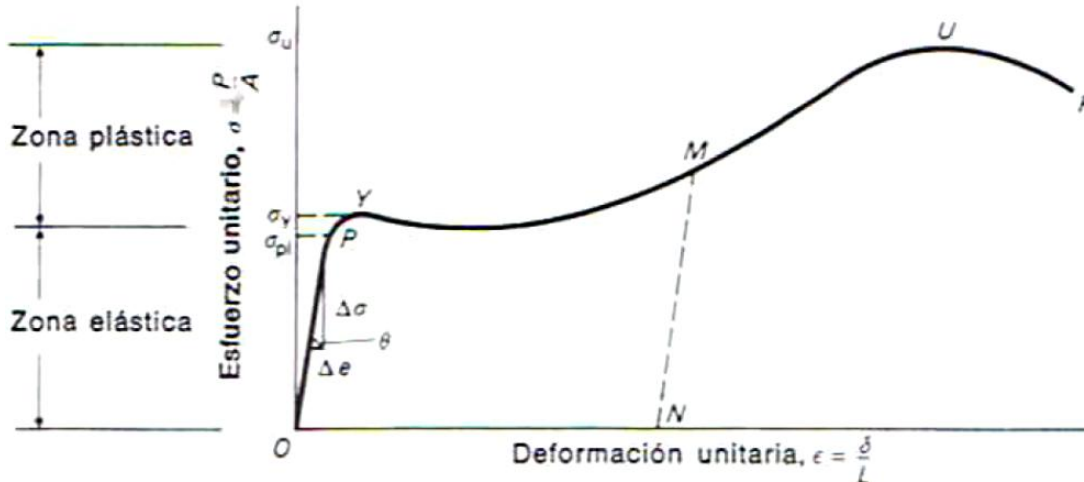
Después de un ensayo de tensión o compresión para un material cualquiera, se construye el diagrama en el que se pueden analizar los datos obtenidos, sobre el cual se trazan los valores del esfuerzo unitario ( $P/A$ ) como las ordenadas y los valores de las deformaciones unitarias ( $\Delta L/L$ ) como las abscisas, obteniéndose una gráfica similar a la mostrada en la Figura 23. La curva inicia en el origen hasta llegar a un punto P, que es el límite de proporcionalidad del material. Para un esfuerzo mayor que el esfuerzo en el límite de proporcionalidad ( $\sigma_{P1}$ ), ya no se cumple la ley de Hooke (Fitzgerald, 1990).

Más adelante entra el punto Y en donde la curva disminuye su pendiente, se hace más horizontal e incluso puede bajar ligeramente y el material se deforma con muy poco o ningún aumento de la carga. El material fluye o se deforma plásticamente. Al esfuerzo en este punto se le llama esfuerzo en el punto de fluencia,  $\sigma_Y$  (Fitzgerald, 1990).

Posteriormente, la curva incrementa su pendiente y alcanza su valor máximo en U. El esfuerzo en este punto ( $\sigma_U$ ) es el esfuerzo último del material, que es el máximo esfuerzo que el material es capaz de soportar. Después, la curva desciende hasta el punto F donde ocurre la fractura del material (Fitzgerald, 1990).

El intervalo plástico de un material es el intervalo de esfuerzos, dentro del cual el material permanece elástico; es decir, regresa a su estado original después de eliminar la fuerza

aplicada. En este intervalo los esfuerzos son menores que el punto de fluencia. Cuando dichos esfuerzos exceden el punto de fluencia, tiene lugar un flujo plástico, y el material nunca vuelve a recuperar su forma original. Este intervalo de esfuerzos se llama intervalo plástico (Fitzgerald, 1990).



**Figura 23.** Ejemplo de diagrama de esfuerzo-deformación unitario para un material (Fitzgerald, 1990).

La expresión para la pendiente  $\theta = \Delta\sigma / \Delta\epsilon$ , es también la definición del módulo de elasticidad o módulo de Young ( $E = \sigma / \epsilon$ ) esta constante de proporcionalidad fue introducida en la ley de Hooke. Una indicación del módulo de elasticidad (o rigidez relativa) del material puede obtenerse observando de la porción inicial de la curva. Entre mayor es la pendiente de la curva, mayor es módulo de elasticidad (o rigidez relativa) del material (Fitzgerald, 1990).

Conociendo las regiones que conforman un diagrama de esfuerzo-deformación se prosigue a analizar los diagramas obtenidos para cada uno de los copolímeros. Cabe mencionar que este análisis solo se realizó al segundo lote de materiales; es decir, a los sintetizados con el segundo quitosano (L3) debido a que no se contaba con las suficientes películas para realizar dicha prueba.

#### 7.2.10.1 Esfuerzo de ruptura a la extensión

Las películas elaboradas a base de polisacáridos se han reportado en la literatura como frágiles, poco flexibles y quebradizas (Sothornvit & Krochta, 2000), estas características se observan en las películas de quitosano, es por ello que en el presente trabajo se funcionalizan con PLA para formar materiales con mejores propiedades mecánicas.

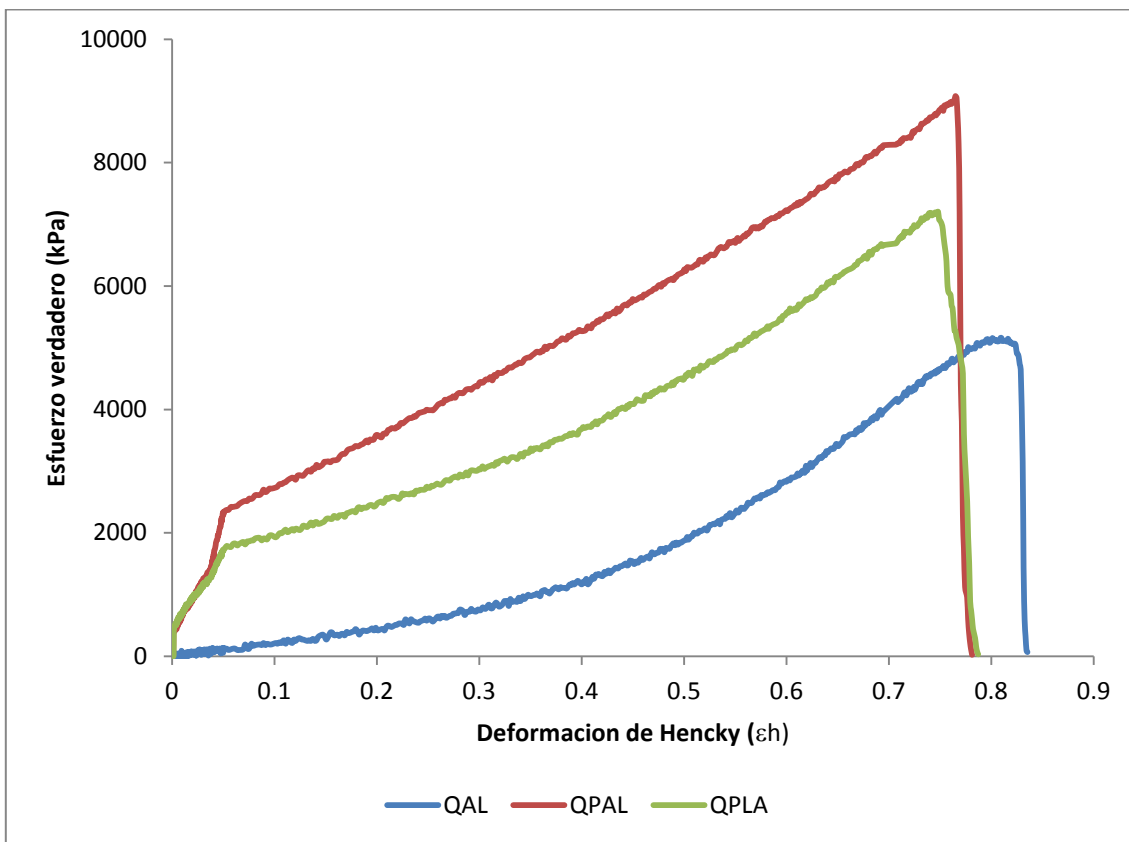
En la Figura 24 se muestran los ejemplos de los perfiles esfuerzo-deformación de en la prueba de extensión de las películas de los copolímeros y en la Tabla 17 se muestran los puntos más importantes deducidos de los perfiles de extensión.

Como se observa en la Tabla 17, el copolímero más elástico fue el QPAL (48200.40kPa), el cual necesita un esfuerzo máximo alto (15998.33kPa) para poder romperse, sin



embargo no se extendió demasiado solo un 56%. Por otro lado, QPLA (39099.20kPa) exhibió un valor de módulo de Young menor que el material anterior resultando menos elástico por lo que necesita un menor esfuerzo para llegar a su fractura (6411.04kPa) y solo se extiende un 33%. Estos dos materiales, al tener un mayor porcentaje de incorporación, se mejora el grado de entrecruzamiento físico de las cadenas a través de la agregación de cadenas laterales hidrófobas lo que conduciría a una disminución correspondiente de la movilidad de la cadena del quitosano aumentando la resistencia a la extensión. Por otro lado, QAL (4763.98kPa) presentó un módulo de Young con un esfuerzo máximo proporcional al módulo de elasticidad y por ello al ser más plástico que elástico su elongación es de 113%.

Los valores de las propiedades mecánicas de cada copolímero fueron en casi todos los casos mayores comparadas con valores de formulaciones de películas de quitosano reportados por He *et al*, (2011), las cuales tenían un módulo de Young entre 1000 y 12000kPa y un esfuerzo máximo entre los 620 y 2730 kPa.



**Figura 24.** Perfiles de esfuerzo-deformación de extensión de QAL, QPAL y QPLA.

Pero contrastan con los reportados por Peschel *et al* (2007) quien desarrollo películas de polihidroxialcoholes (PHA) con quitosano, obteniendo en una de sus formulaciones valores similares a los reportados en este trabajo, sin embargo con otra formulación de quitosano y PHA se obtuvieron valores mayores a los reportados en este trabajo en cuanto a propiedades mecánicas.

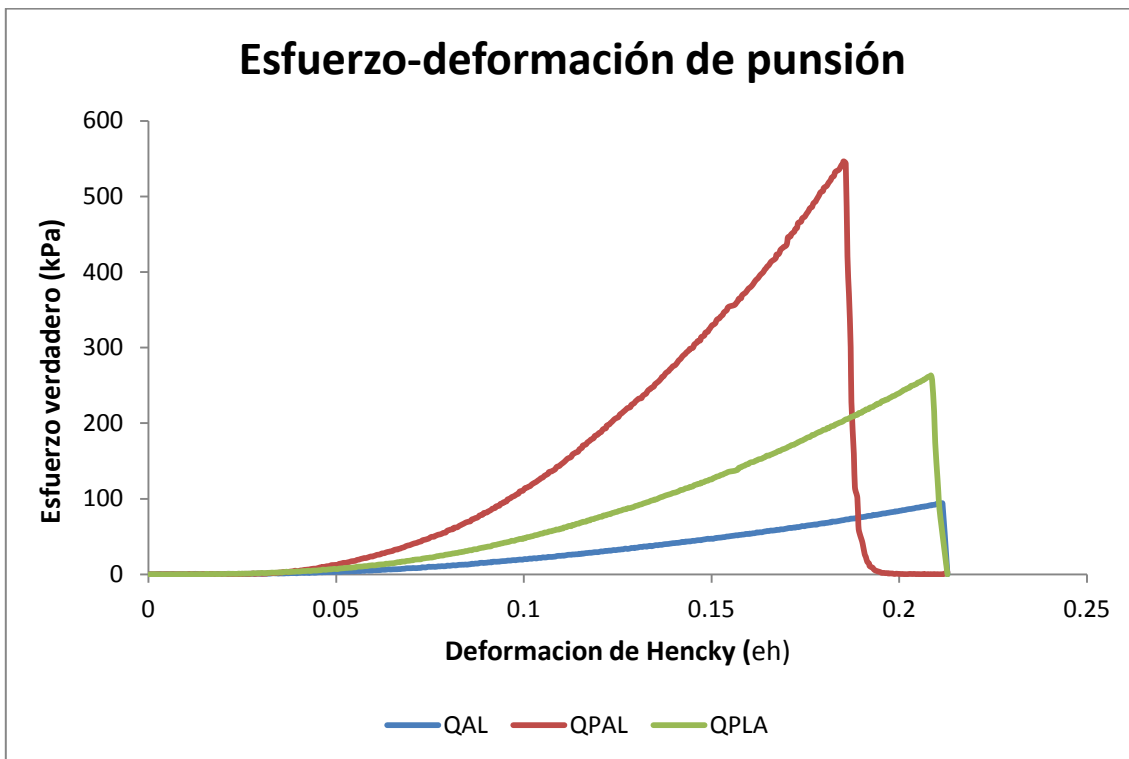
**Tabla 17.** Propiedades mecánicas obtenidas de la fuerza de ruptura a la extensión para QAL, QPAL y QPLA.

Muestra	Módulo de Young (kPa)	Esfuerzo Max (kPa)	Elongación (%)
QAL	4763.98 $\pm$ 292.76	4667.26 $\pm$ 447.53	113.41 $\pm$ 11.23
QPAL	48200.40 $\pm$ 9518.58	15998.33 $\pm$ 2346.13	56.85 $\pm$ 7.43
QPLA	39099.20 $\pm$ 14629.97	6411.04 $\pm$ 1369.90	33.91 $\pm$ 3.79

Los resultados son promedios de cinco determinaciones y sus desviaciones estándar.

### 7.2.10.2 Prueba de esfuerzo a la punción

Estos mismos materiales fueron sometidos a una prueba de punción en la que los perfiles de cada material se observan en la Figura 25 y las propiedades mecánicas en la Tabla 18.



**Figura 25.** Perfil de esfuerzo-deformación de punción para QAL, QPAL y QPLA.

**Tabla 18.** Propiedades mecánicas obtenidas de la fuerza de ruptura a la punción para QAL, QPAL y QPLA.

Muestra	Módulo de Young (kPa)	Esfuerzo Max (kPa)	Elongación (%)
QAL	442.74 $\pm$ 122.18	132.16 $\pm$ 40.59	23.63 $\pm$ 0.10
QPAL	2507.26 $\pm$ 1299.94	493.98 $\pm$ 233.72	16.33 $\pm$ 7.28
QPLA	824.00 $\pm$ 375.56	229.05 $\pm$ 83.79	23.03 $\pm$ 1.11

Los resultados son promedios de cinco determinaciones y sus desviaciones estándar.

En esta prueba los materiales muestran resultados similares en cuanto al orden de presentar de mayor a menor módulo de elasticidad. Y como se mencionó, el valor del módulo va relacionado con un mayor porcentaje de incorporación. Sin embargo estos resultados son más bajos a los reportados en la extensión lo que podría deberse al área

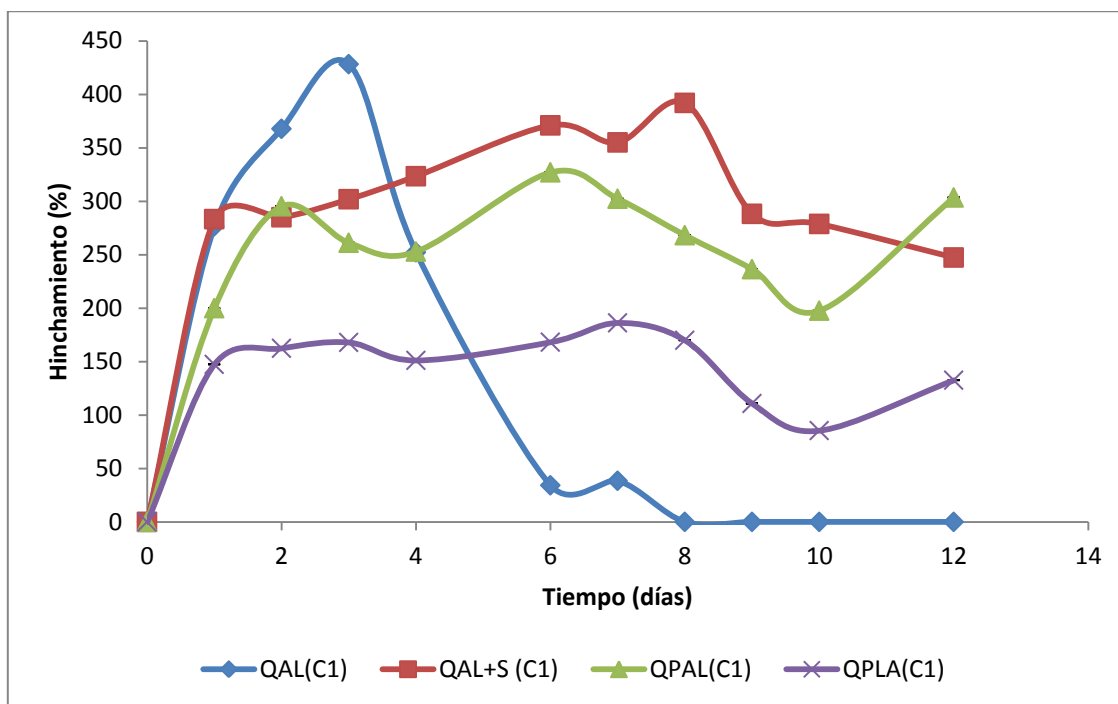
donde se aplica la fuerza que ahora es mayor, sin embargo estos valores son mayores a los reportados en la literatura.

## 7.2.11 Pruebas fisicoquímicas

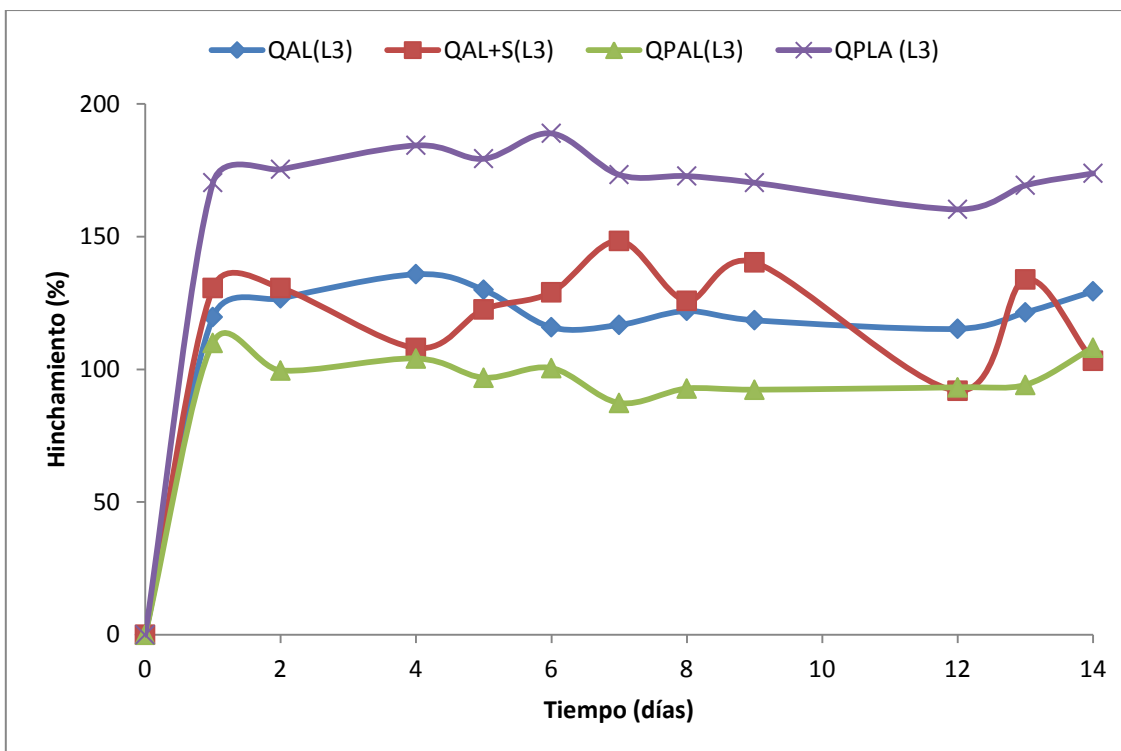
### 7.2.11.1 Prueba de porciento de hinchamiento (%H)

Normalmente, el comportamiento de hinchamiento de los materiales poliméricos depende de las magnitudes relativas de la difusión del agua y los tiempos de relajación del polímero; en el pH fisiológico los copolímeros presentan el mismo comportamiento de hinchamiento, aunque el proceso de hinchamiento es mucho más rápido y requiere menos tiempo para alcanzar su equilibrio comparado con el proceso de hinchamiento en pH ácidos, en los cuales el proceso es más lento pero se obtiene un mayor porcentaje de hinchamiento debido a la protonación del grupo amino del quitosanos.

Con esta prueba se determinó la cantidad de líquido (medio DMEM pH 7.4) que absorbe el polímero para su posterior uso en las pruebas biológicas por lo que en la Figura 26 y 27 se observa las cinéticas de hinchamiento a través del tiempo y en la Tabla 19 se observa el valor del porcentaje de hinchamiento de los diferentes copolímero.



**Figura 26.** Perfil de hinchamiento de los copolímeros del quitosano C1 a través del tiempo.



**Figura 27.** Perfil de hinchamiento de los copolímeros del quitosano L3 a través del tiempo.

Esta cinética se siguió por catorce días para determinar si el polímero llegaba a un punto estable o dar una un panorama de su degradación. Cabe mencionar que para los cálculos de la Tabla 19 se tomó el máximo hinchamiento debido que los tres materiales se comportaron como un hidrogel iónico, es decir, que fueron muy sensibles a los cambios de pH del medio, cambiando su capacidad de hinchamiento haciendo difícil tomar un punto estable que no variara en un 2%, y si llegaba a un pseudo-punto estable era cuando el polímero se deshinchaba; el problema de esto es que el polímero se volvió a hinchar como se observó en lo perfiles de cada uno de los copolímeros.

**Tabla 19.** Porcentaje de hinchamiento en medio DMEM a 36.5 °C de QAL, QPAL y QPLA preparados con de los quitosanos C1 y L3.

Material	Hinchamiento quitosano C1 (%)	Hinchamiento quitosano L3 (%)
QAL	367.78 ±0.0089	135.88 ±0.0178
QAL+S	168.17 ±0.0002	148.39 ±0.0033
QPAL	355.02 ±0.0014	109.95 ±0.0206
QPLA	252.94 ±0.0031	188.94 ±0.0026

Los resultados son promedios de tres determinaciones y sus desviaciones estándar.

Como se observa en la tabla 19, QAL (C1) absorbe más medio que QAL (L3), esto pudo ser porque el primero tiene más cadenas laterales hidrófobas o mayor porcentaje de

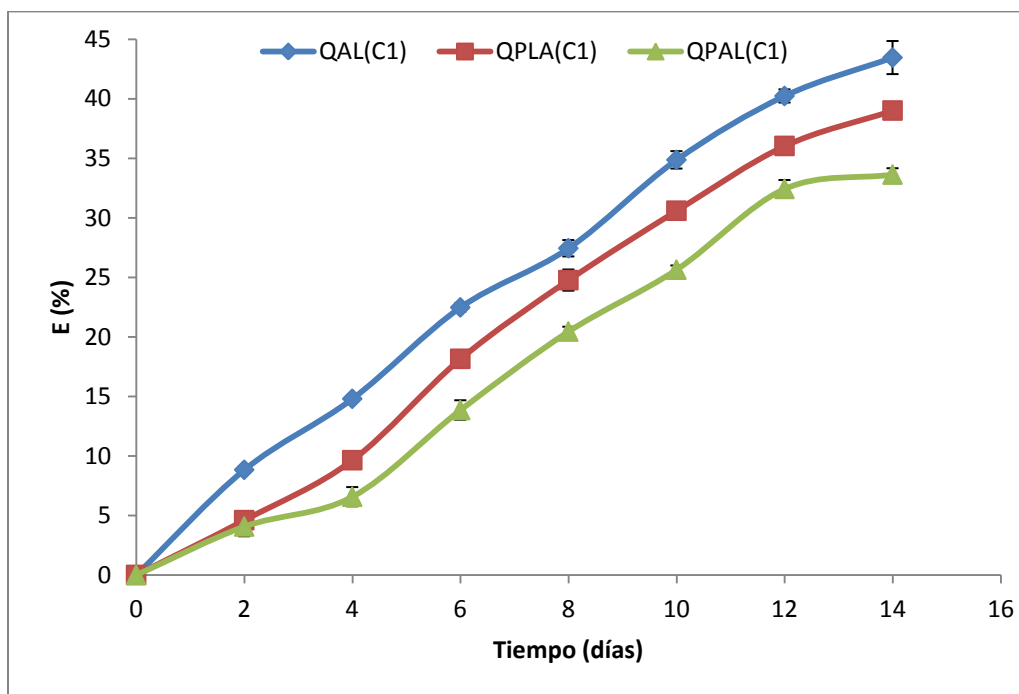
incorporación que el segundo, lo que conduciría a un aumento de la capacidad de hinchamiento de QAL (C1) debido a que se vuelve un material más amorfo como se observa en los perfiles de rayos X.

Sin embargo QPAL y QPLA del segundo quitosano (L3) absorben menor cantidad de medio que su contraparte QPAL y QPLA del primer quitosano (C1), esto debido a que al hacer crecer en mayor medida las cadenas laterales hidrófobas se hacen más fuertes los enlaces de hidrógeno entre éstas, formando la estructura cristalina del PLA como se observa en los perfiles de rayos X para los primeros copolímeros, lo que conducirá a la reducción de la capacidad de hinchamiento de las muestras.

Estos valores a los encontrados en la literatura son bajos, debido a que Depan *et al*, (2006) reportan un copolímeros de quitosano-g-ácido láctico y montmorillonita que hincha desde un 219 a 480% en sus diferentes formulaciones.

### 7.2.11.2 Prueba de erosión (%E)

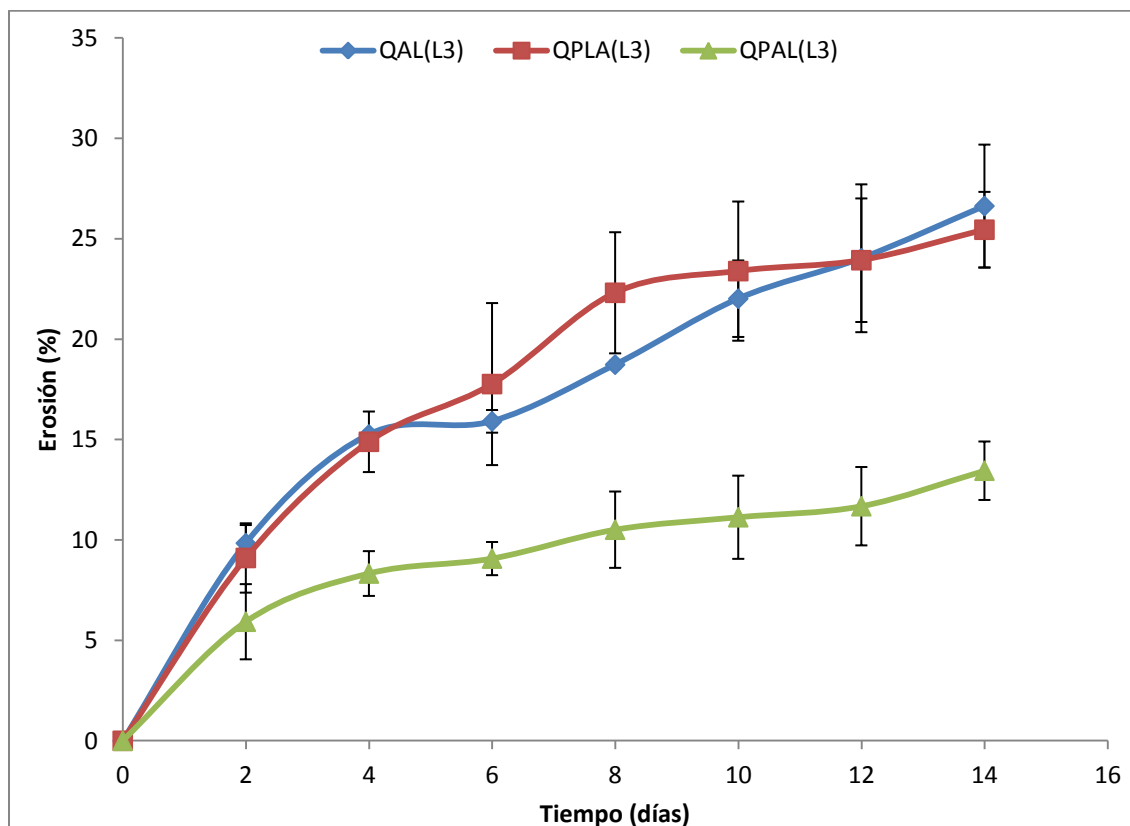
En esta prueba se determinó de manera aproximada el tiempo de degradación de los copolímeros simulando condiciones experimentales de las pruebas biológicas, los resultados obtenidos en esta prueba sirvieron para determinar tiempos de análisis en las pruebas biológicas debido a que se busco tener adhesión celular antes de que el polímero se degradara en un 50%. En el Figura 28 se muestra como se degradaron los copolímeros del quitosano C1 a través tiempo (14 días).



**Figura 28.** Cinética de degradación en medio DMEM de QAL, QPAL y QPLA preparados a partir del quitosano C1.

Se observa en la Figura 28 los polímeros fueron degradando de forma constante hasta los 13 días que es cuando hay un cambio en las pendientes de las curvas de degradación, el compuesto que más se degradó fue QAL (43%), después QPLA (39%) y por último QPAL (33%). Esto debido a que en el injerto los materiales adoptan una estructura amorfa (perfiles de difracción de rayos X), siendo el orden de cómo se degradan de mayor a menor similar a al perfil de difracción del compuesto más amorfo al menos amorfo.

En la Figura 29 se muestra cómo se degradaron los copolímeros del quitosano L3 a través del tiempo (14 días).



**Figura 29.** Cinética de degradación en medio DMEM de QAL, QPAL y QPLA preparados a partir del quitosano L3.

La degradación alta de estos materiales se debe principalmente al PLA, debido a que la etapa de degradación de este compuesto inicia por sus regiones amorfas con una mayor velocidad de absorción de agua, induciendo la hidrólisis de las cadenas amorfas.

Por otro lado, los materiales a base del quitosano L3 en contraste con los materiales anteriores tuvieron menor degradación, siendo QPAL (26%) el que más se degradó, seguido de QAL (25%) y por último QPLA (13%), el valor de degradación de QPAL se debe a que sigue en una forma amorfa como se observa en el perfil de rayos X, mientras que para QAL y QPLA se puede deber a la degradación tanto del PLA como del quitosano.

Estos últimos valores de degradación fueron similares a los reportados por Xie *et al*, (2010) en un copolímero de quitosano-g-poli (láctido y glicólido). En condiciones similares a este experimento, sus polímeros degradaron alrededor de entre un 13.6% y 20% en sus diferentes formulaciones en un tiempo de 2 semanas.

### 7.2.12. Determinaciones de ángulo de contacto

Durante la realización de las pruebas biológicas se observó que al inocular con la suspensión de células la gota no se diseminaba lo que indicaba hidrofobicidad del material, por lo que se les realizó una prueba de ángulo de contacto a los materiales sintetizados (Tabla 20).

**Tabla 20.** Ángulo de contacto para los copolímeros QAL, QPAL y QPLA sintetizados a partir del quitosano L3.

<b>Copolímero</b>	<b>Ángulo de contacto (°)</b>
<b>QAL(L3)</b>	73.47 ±2.20
<b>QPAL(L3)</b>	93.97 ±2.16
<b>QPLA(L3)</b>	94.11 ±2.31
<b>Teflón</b>	119.03 ±5.20

Los resultados son promedios de tres determinaciones y sus desviaciones estándar.

Los copolímeros QPAL y QPLA por tener una mayor incorporación moléculas AL son hidrofóbicos en su superficie, mientras que QAL es hidrofílico en su superficie. Esto mismo fue reportado por Xie *et al*, (2010) y Depan *et al*, (2006), que a una mayor incorporación de PLA se obtiene un mayor ángulo de contacto, por la formación de zonas hidrofóbicas.

## 7.3 Pruebas biológicas: viabilidad de fibroblastos humanos y actividad antimicrobiana.

### 7.3.1 Ensayos celulares con los polímeros del quitosano C1.

#### 7.3.1.1 Primer ensayo celular.

En el ensayo solo se trabajó con QAL, QPAL y QAL+S (este último material es QAL con la adición de 1% de sorbitol para alargar su vida media, porque el sorbitol funciona como un plastificante), y QPLA no se incluyó porque no pudo ser cortado, estaba muy seco. Estos fueron cortados en círculos de 5mm de diámetro para que al momento de hinchar cubriera el pozo completo de la placa. Después de ser esterilizados se lavaron 7 veces con PBS y después 5 veces con medio, se dejaron secar en la campana de flujo laminar, después se inocularon con una cantidad de 50 mil células, se dejaron por alrededor de una hora en incubación para permitir la adhesión de las células y después se agregaron 200 µL de medio y se dejó incubando por 5 días.

Resultados: En las unidades experimentales se observó una gran cantidad de células pero sin adherirse a los polímeros, estos resultados pudieron haberse debido a que el medio se acidificó (pH 6.3) porque los lavados no fueron los suficientes para retirar todas las impurezas del copolímero. Sin embargo por falta de calceína no se realizó la prueba de viabilidad celular. Se realizó la microscopía electrónica de barrido (MEB) tanto a los controles como a los experimentales sin encontrar ninguna célula.

#### **7.3.1.2 Segundo ensayo celular.**

Debido a que en el ensayo anterior no hubo presencia de células por la acidez del medio, se aumentó el número de lavados de PBS (10) y se agregaron tres lavados con un medio basificado y los 5 con medio DMEM para tener los materiales en las condiciones idóneas (el polímero este a pH fisiológico y estéril) de cultivo. En este ensayo se incluyó el material QPLA.

Resultados: A los 5 días de cultivo la cantidad de células disminuyó aproximadamente un 25% en comparación con el día 0, no se observaron células adheridas a los polímeros pero siguen estando en su forma de esférica; cabe mencionar que en QPLA y QPAL se complicó el observar las células debido a su forma rugosa por lo que resultó difícil enfocar dichas células. En la prueba de viabilidad celular los polímeros presentaron células vivas (verde fluorescente) y muertas (rojo); sin embargo las células vivas no estuvieron adheridas a los polímeros por lo que no están expresando su fenotipo (tienen una morfología alargada). La MEB de las unidades experimentales reveló que éstas no presentaron células. En este ensayo la ausencia de células podría atribuirse al lavado de los polímeros con el medio básico, que al basificar el medio causó la muerte de las células. Debido a que en este ensayo no se obtuvo resultado favorable con las células se realizó un tercer ensayo.

#### **7.3.1.3 Tercer ensayo celular.**

En este ensayo se comparó el efecto de lavar tres veces contra lavar solo una vez los polímeros con medio DMEM básico, debido a que en el ensayo anterior se atribuyó la muerte celular a que el medio se basificó, se realiza este ensayo para comprobar o rechazar la hipótesis de que fue por el medio básico, los demás lavados fueron igual que el ensayo anterior.

Se determinó que había más células en el tratamiento con tres lavados que con un lavado con medio básico. En la prueba de viabilidad celular se observó que en los polímeros había tanto células vivas como muertas pero no adheridas; además, con estas condiciones de lavado los polímeros se degradan, por lo que se determinó usar solo un lavado con medio básico. Los resultados de este ensayo sirvieron para establecer el protocolo de lavado de los materiales, el cual consiste de 10 lavados con PBS, 1 lavado con medio básico y 5 lavados con medio solo. Las micrografías de este ensayo se observan en el anexo A4. Porque sigue sin haber adhesión celular (anexo A4).



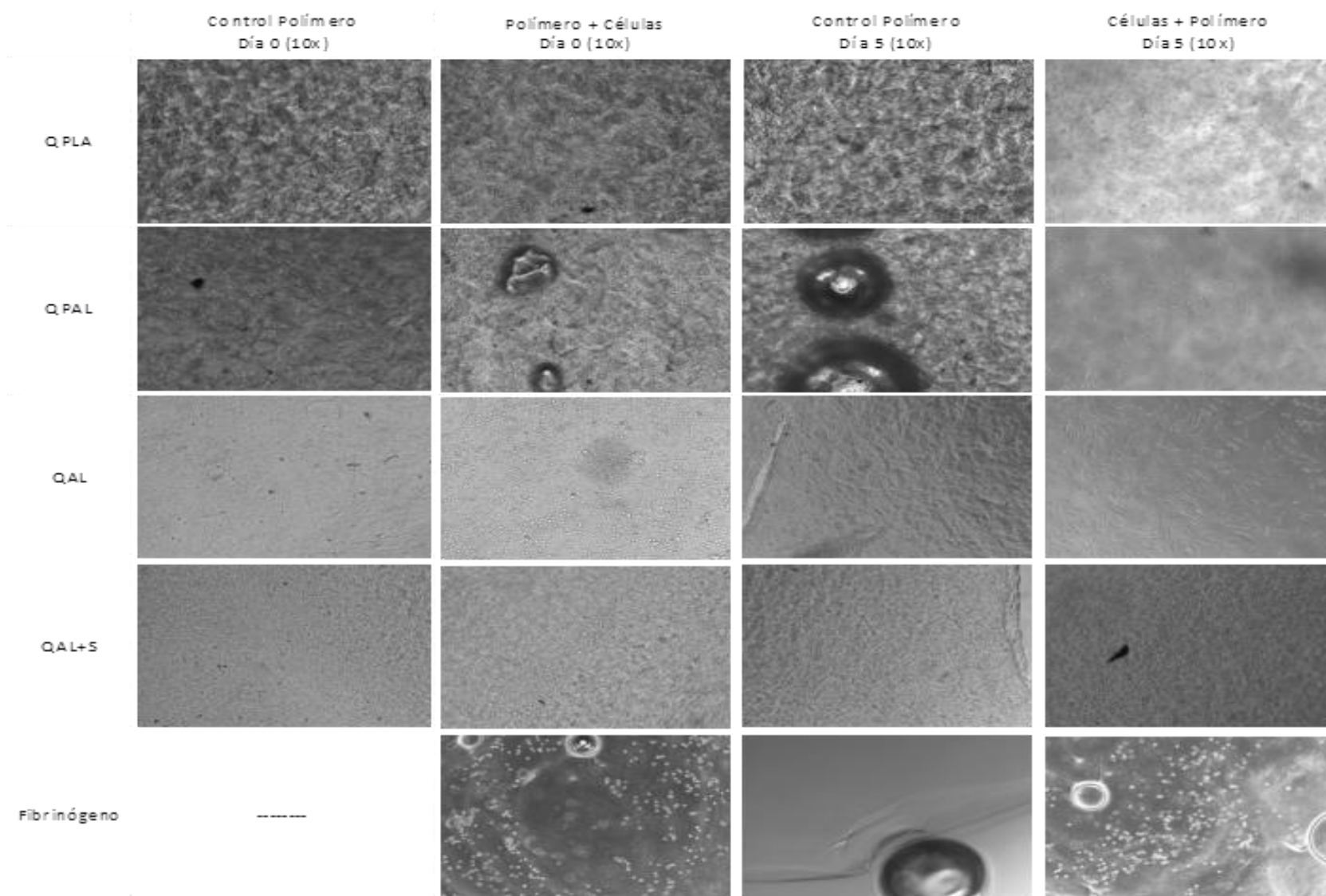
#### 7.3.1.4 Cuarto ensayo celular.

Debido a que las células no se adhirieron en los métodos anteriores, se incluyó al método un paso más, que consistió en agregarle a los polímeros fibrinógeno para determinar si las células vivas se podían adherir, el fibrinógeno coadyuva en la adhesión celular porque es precursor de la fibrina, ésta forma una red tridimensional la cual permite el alojamiento de las células con una alta tasa de proliferación (Meana *et al*, 1998; Pellegrini *et al*, 1999). En la Figura 30 se presentan las micrografías de luz visible de los copolímeros.

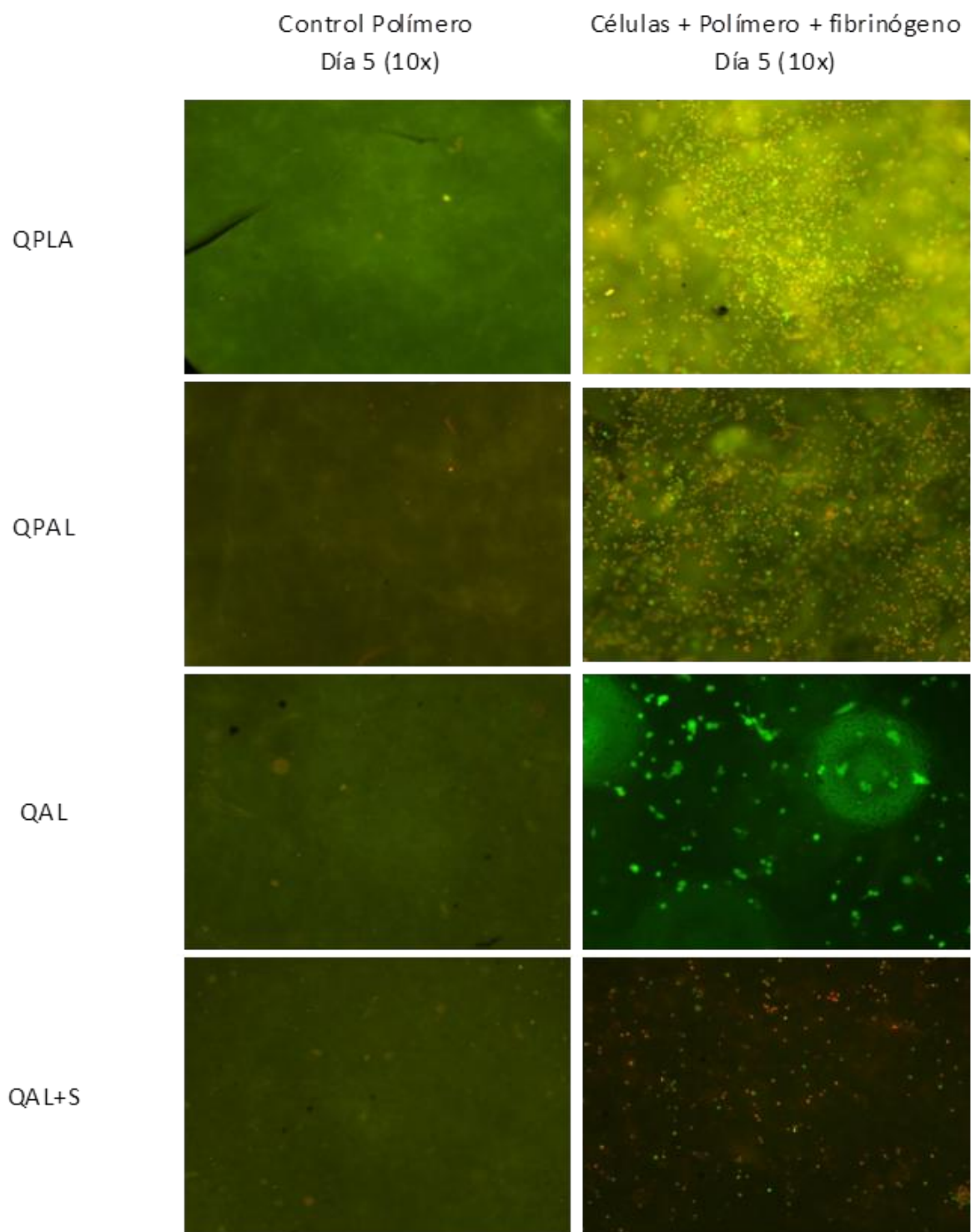
Se observa que en los cuatro polímeros hubo células, como en los tres ensayos anteriores. Solo que a diferencia de los tres ensayos anteriores ahora en QAL con ayuda del fibrinógeno las células estaban adheridas al material y expresando su fenotipo (forma alargada). En este ensayo también se incluyó una unidad experimental en la que solo serían la células más fibrinógeno para determinar si la expresión del fenotipo se debía por el fibrinógeno, pero los resultados indican que las células en fibrinógeno solo se quedan con su morfología de inicio.

Al igual que en los casos anteriores a los polímeros con células se le realizó la prueba de viabilidad para determinar si las células observadas estaba vivas o muertas, los resultados se observan en la Figura 31, En donde se aprecia que en todos los polímeros hay células vivas y muertas, como en los ensayos anteriores, sin embargo la diferencia con los ensayos anteriores y en particular en el polímero QAL, se observan células vivas adheridas y expresando su fenotipo, es decir, tiene una forma alargada. La adhesión y viabilidad en un solo copolímero fue por la difícil aplicación del fibrinógeno en la superficie de los polímeros, por lo que no se tuvo una capa homogénea en la superficie de lo mismo que hiciera comparable este experimento. además si agrega el fibrinógeno no se evalúa la citocompatibilidad del polímero, puesto que los fibroblastos crecerían sobre la matriz formada por este compuesto y no directamente en el copolímero.

Este fue el último ensayo con los materiales del primer lote pues con la información recabada de estos ensayos se sintetizaron los materiales con el quitosano L3 tratando de eliminar las deficiencias de los anteriores materiales.



**Figura 30.** Micrografías de luz visible de los copolímeros del quitosano C1 del cuarto ensayo.



**Figura 31.** Micrografías de fluorescencia de la prueba de calceína de los polímeros de quitosano C1 de cuarto ensayo.

### **7.3.2 Ensayos celulares con los polímeros del quitosano L3.**

#### **7.3.2.1 Primer ensayo celular.**

Las mejoras que se hicieron a los materiales sintetizados a base del quitosano L3 con respecto a los materiales anteriores fue disminuir el color amarillo de las películas que hacían difícil el análisis al microscopio, además, los materiales QPLA y QPAL se hicieron lisos porque su textura rugosa no permitían enfocar en el microscopio a las células y éstas se degradaban más rápido.

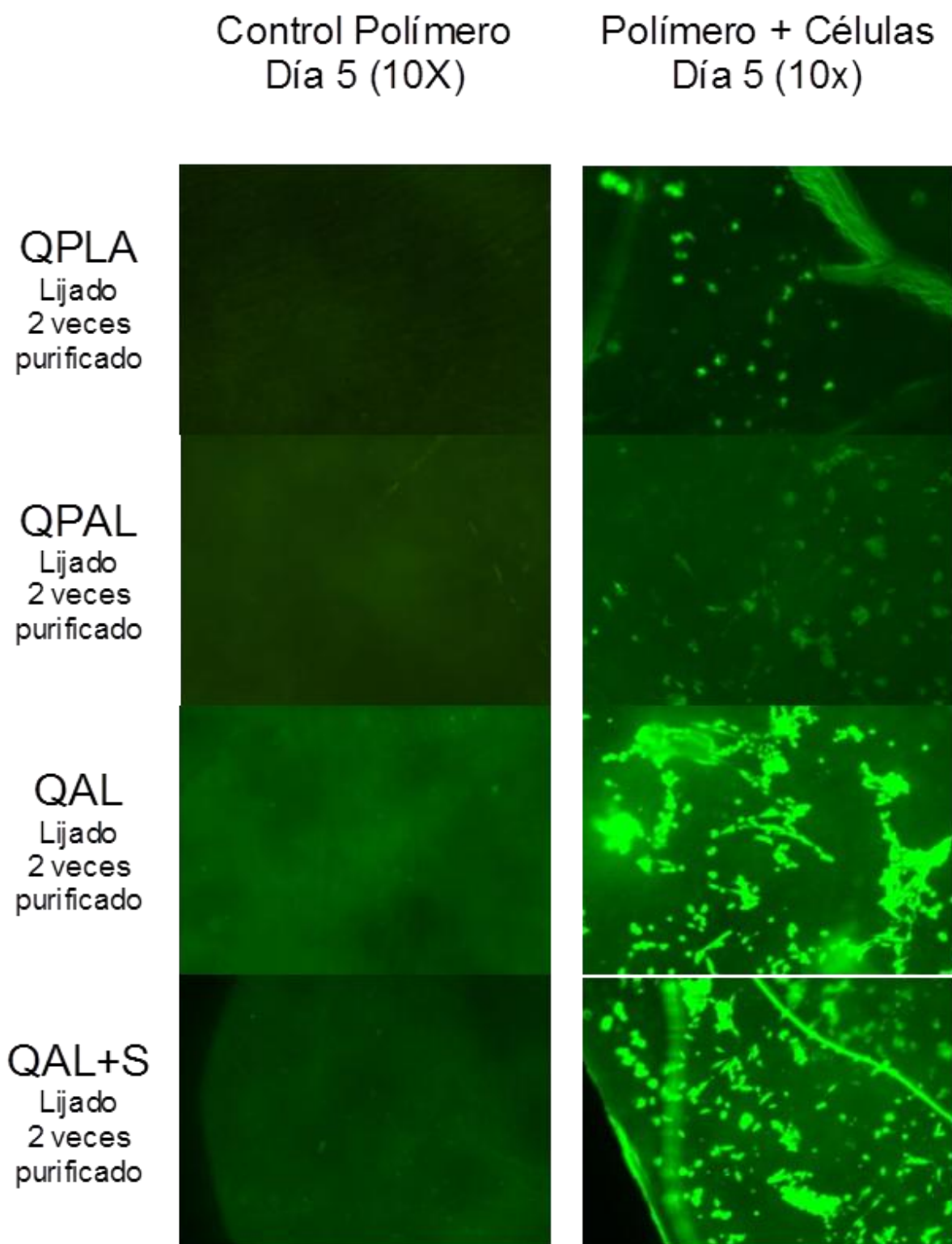
En este ensayo se analizaron los nuevos polímeros con el mismo protocolo de acondicionamiento realizado con los materiales del quitosano anterior. Sin embargo se les hicieron más lavados tanto de PBS (15) como de medio (10) porque no se estabilizaban a un pH de 7.4. Por otra parte el tamaño de los materiales cambió de 5 a 8 mm de diámetro debido a que estos materiales hinchaban menos y no cubrían el pozo de la placa comparados con los del lote anterior, cuando se logró obtener las condiciones deseadas se realizó el experimento con las células y después del quinto día de cultivo se analizaron.

Se realizó la prueba de viabilidad celular y al igual que con el quitosano anterior, se encontraron células vivas y muertas pero no adheridas y mantenían su forma esférica, lo cual se atribuyó al bajo pH del medio. Debido a que los resultados de los ensayos de cultivo celular no habían resultado satisfactorios, se decidió realizar un ensayo más en el que se harían dos nuevos tratamientos a los polímeros.

#### **7.3.2.2 Segundo ensayo celular.**

En este ensayo a los materiales se les realizó una segunda purificación, con acetona en un soxhlet, después se lijaron ( con una lija de agua, haciendo círculos de forma suave) en la superficie debido a que se tiene la teoría que estos compuestos en la superficie son hidrofóbicos debido al porcentaje de incorporación de ácido láctico. Después de estos tratamientos los materiales se acondicionaron con el protocolo determinado con los materiales del quitosano C1 y se agregó un lavado con agua desionizada. A estos materiales se les realizó la prueba de viabilidad con el mismo método que a los anteriores materiales. Los resultados se muestran en la Figura 32.

La figura reveló que los materiales QAL y QAL+S presentan células vivas adheridas y alargadas, mientras que en los de QPAL y QPLA no hubieron células adheridas pero sí vivas. Entonces estos dos tratamientos en la preparación de los materiales fue clave para la adhesión celular. Entonces para comprobar la teoría de que los polímeros eran hidrofóbicos en su superficie se realizó una prueba de ángulo de contacto (Sección 7.2.12) en la cual se corrobora que los materiales QPAL y QPLA son ligeramente hidrofóbicos en su superficie lo que impide la interacción con las células puesto que al no deshacerse la gota de agua, las células quedan flotando en la gota sin romper la tensión superficial del agua (medio). Además surgió la pregunta de si el hecho de haber realizado una segunda purificación a los materiales les había ayudado a la adhesión, por lo que consiguientemente se realizó un ensayo más.



**Figura 32.** Prueba de calceína para los polímeros QAL, QPAL y QPLA del quitosano L3, del segundo ensayo.

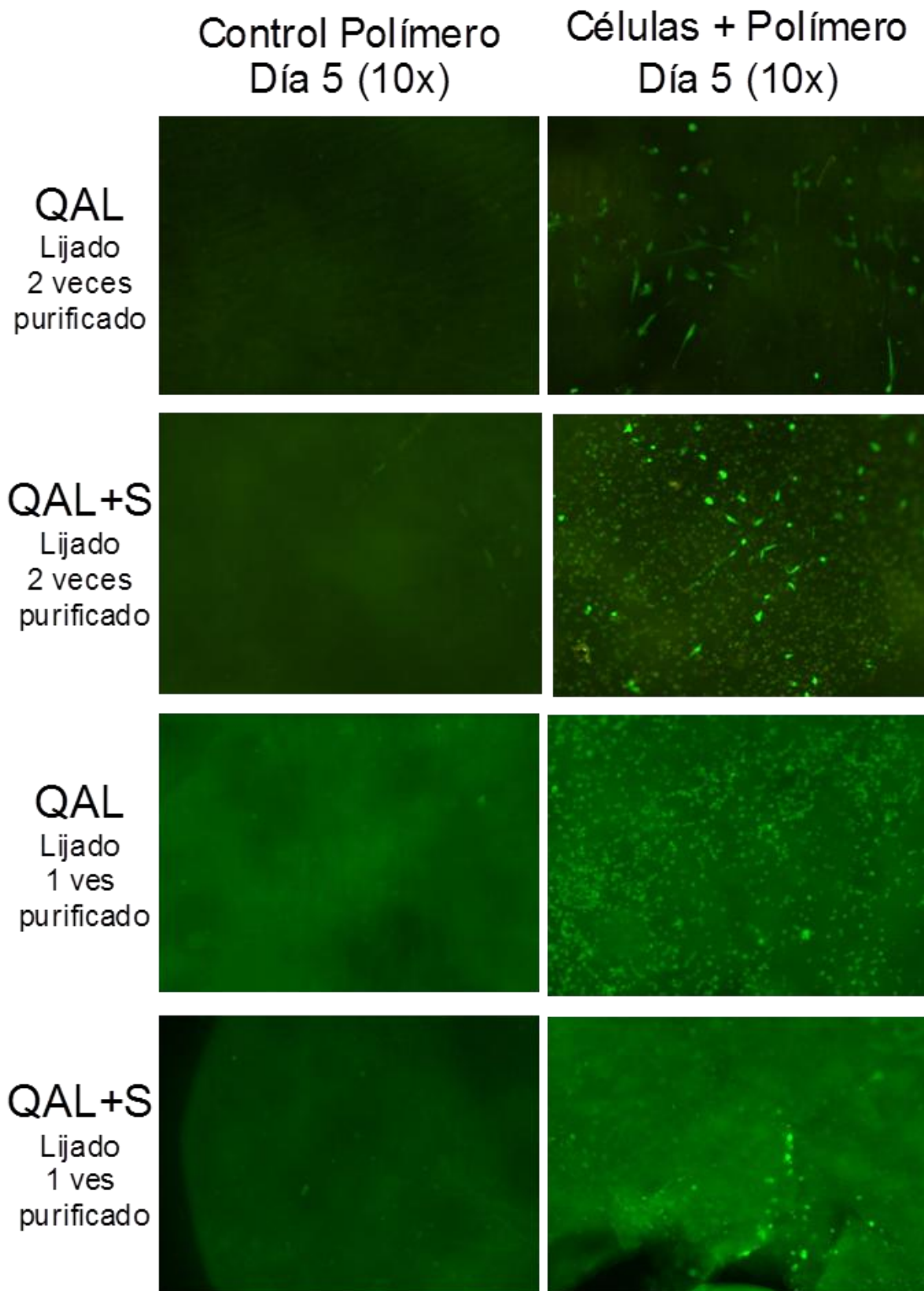
Entonces, la primera purificación para los materiales QPAL y QPLA fue una precipitación directa en acetona mientras que para QAL y QAL+S se realizó en un Soxhlet por 12 horas, la segunda purificación para los copolímeros se llevó en el Soxhlet por 6 h por lo que el proceso de purificación del material QAL y QAL+S fue en un tiempo total de 18 h en Soxhlet.

#### **7.3.2.3 Tercer ensayo celular.**

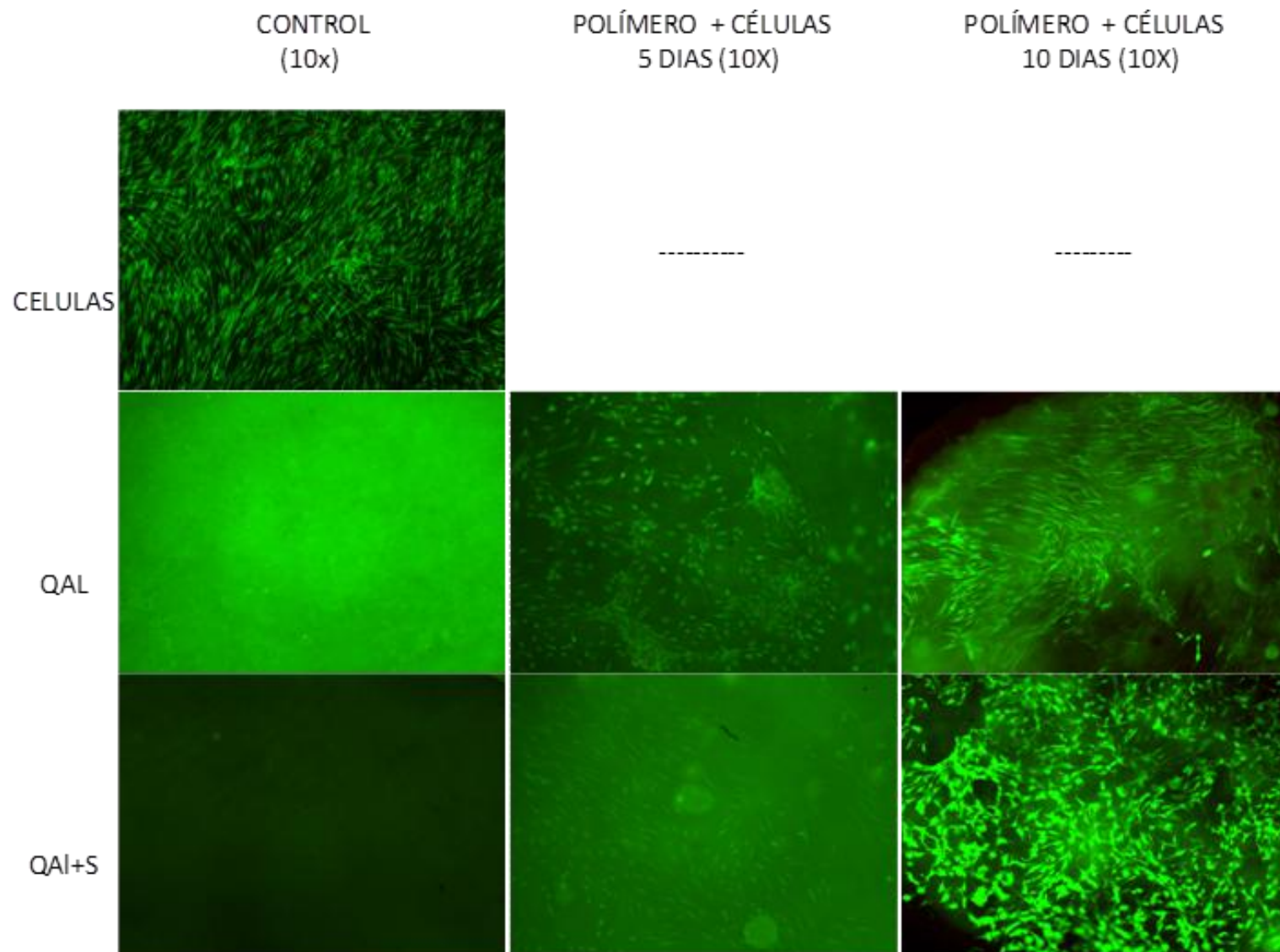
Debido a que en el anterior ensayo no hubo ninguna adhesión de las células en los materiales QPAL y QPLA, estos materiales se descartaron de estas pruebas celulares y solo se trabajaron con QAL y QAL+S debido a que se logró la adhesión celular. Por lo tanto, en este ensayo se evaluó el efecto de una segunda purificación a los materiales QAL y QAL+S, y materiales sin esta purificación, y se les dio el mismo protocolo de lavado que a los anteriores materiales así como el lijado. Después de preparados, los materiales fueron inoculados y después de 5 días de incubación se les realizó la prueba de viabilidad celular. Los resultados se observan en la Figura 33. En donde las micrografías muestran que los materiales purificados dos veces y lijados permiten la adhesión celular y por lo tanto se encontraron células vivas y alargadas, mientras que en los que no recibieron este tratamiento hubieran células vivas pero sin adhesión celular.

#### **7.3.2.4 Cuarto ensayo celular.**

Los resultados de estos ensayos celulares fueron: los polímeros QAL y QAL+S purificados por 18 h fueron los que presentaron fibroblastos vivos y adheridos por lo que se descartó a QPLA y QPAL para las pruebas biológicas, en cuanto al tamaño se cortaron a 8 mm porque con el tamaño anterior no se logró cubrir el pozo completamente. Por otro lado, el protocolo estándar final de acondicionamiento de los polímeros después de la esterilización quedó de la siguiente manera: 10 lavados de PBS, 1 lavado con DMEM básico y 5 lavados con DMEM, y 1 lavado con agua desionizada, sin la necesidad de lijar los polímeros. Con estos resultados se realizó un cultivo celular con más tiempo de incubación para determinar si las células siguen vivas. Por lo que los polímeros después de ser inoculados e incubados se analizaron por medio del kit de calceína a los 5 y 10 días. Los resultados se presentan en la Figura 34. Como se observa, en la Figura 34 a los 5 días las células comienzan a adherirse y expresar su morfología pues cambian de su forma esférica a alargada, a los 10 días se tiene una mayor cantidad de células debido a que el quitosano promueve la proliferación de los fibroblastos como lo observó Yao *et al*, (2003) y además los fibroblastos están más alargados. La no adhesión en los primeros materiales y la muerte de las células estaba relacionada con la degradación de los compuestos, principalmente como se observó en la sección 7.2.11.2, que por tener una estructura amorfa los polímeros, se degradaban más rápido en las cadenas laterales superficiales compuestas de PLA (zonas amorfas) liberando al medio monómero (ácido láctico) lo que acidifica el medio, causando cambios en la membrana de las células y dando como resultado la no adhesión al polímero y en algunos casos hasta la muerte celular.



**Figura 33.** Prueba de calceína para QAL y QAL+S del quitosano L3 del tercer ensayo celular.



**Figura 34.** Prueba de viabilidad de QAL y QAL+S del quitosano L3 del cuarto ensayo.



En el caso de los segundos materiales, la no adhesión en los primeros ensayos pudo deberse a la misma razón que en los primeros polímeros, pero después de la segunda purificación se observó que no había muerte celular, sin embargo seguían sin adherirse la células, esto se debe a la relación de hidrofiliidad/hidrofóbicidad de los compuestos, es decir, el quitosano es un compuesto hidrofílico comparado con el PLA que es más hidrofóbico; al hacer el injerto, las cadenas se acomodan formando regiones hidrofóbicas (formadas de PLA) que en los compuestos de QPAL y QPLA quedaron en la superficie de las películas y aunque se lijaron, el arreglo de los mismos (sección 7.2.8) seguía exponiendo zonas hidrófobas.

Estas zonas hidrófobas al contacto con el agua del medio formaban una zona cargada negativamente causando una repulsión de cargas con las cargas negativas de las membranas celulares, impidiendo así la adhesión celular.

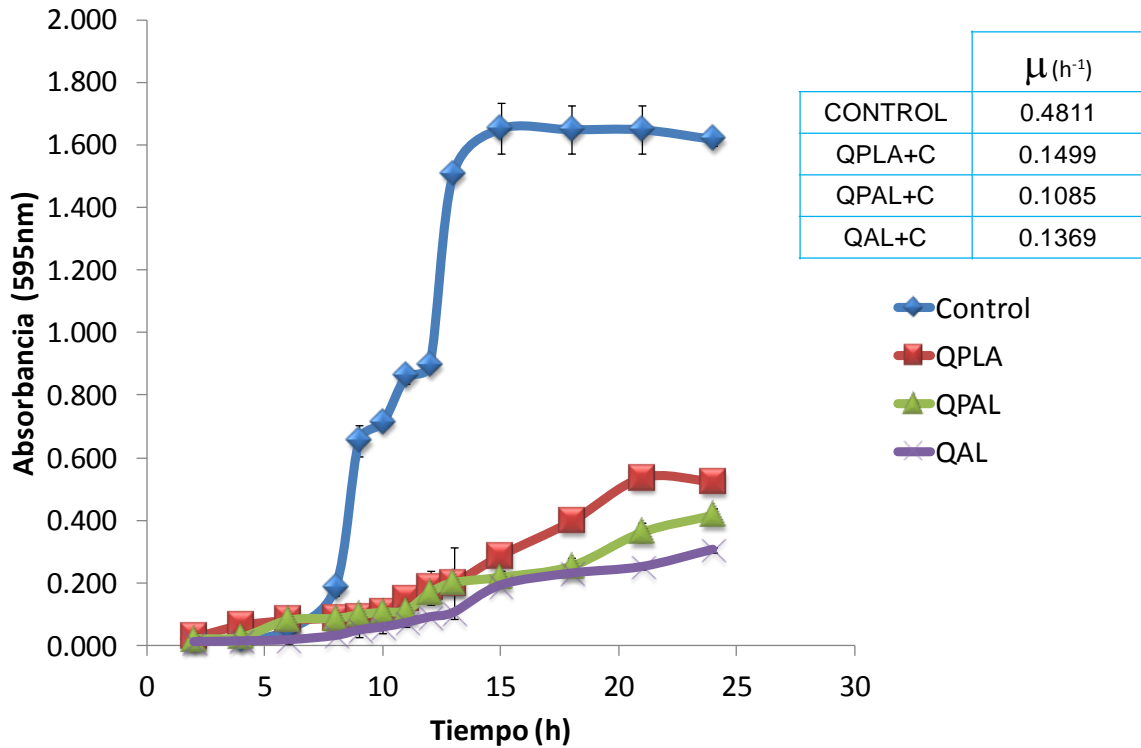
A diferencia de lo reportado por Yao *et al*, (2003) y Xiao *et al*, (2008), en este trabajo se muestra la adhesión de los fibroblastos a los materiales y no la proliferación como evidencia de que el material tiene potencial para funcionar como un andamio celular.

Al comparar con lo reportado por Ding *et al*, (2004) en el presente trabajo se tienen mejores resultados, ya que estos investigadores muestran micrografías de luz visible de fibroblastos pero en un tiempo de 2 días las células aun siguen en su forma esférica, sin mostrar adherencia, además de que no demuestran si están vivas o muertas.

Además, se muestran resultados similares en cuanto a adhesión celular a lo reportado por Xie *et al*, (2010) quienes en un sistema de quitosano /poli (láctido-co-glicólido) muestran adhesión celular de fibroblastos pero hasta los 7 días de cultivo celular.

### **7.3.3 Prueba de actividad antimicrobiana de los materiales.**

Debido a que el quitosano en ciertas condiciones (pH menores a 6) actúa como un agente microbiano se realizó una prueba de inhibición para probar si los materiales aparte de tener un posible uso como andamio celular podían dar protección contra infecciones bacterianas, por lo que se utilizó la cepa de *P. aeruginosa* que es una de las principales bacterias causante de infecciones en nosocomios. Los resultados se muestran en la figura 35.



**Figura 35.** Efecto de inhibición de los materiales a base de quitosano L3.

Como se observa en la figura 38 el compuesto que causa más inhibición en la curva de crecimiento es el compuesto QAL, pero al hacer la comparación en la tasa específica de crecimiento se observa que el más inhibitorio es QPAL, sin embargo los tres materiales disminuyen un 75% las tasa de crecimiento de la bacteria. Esta inhibición puede deberse a que conforme la bacteria va creciendo y consume los componentes del medio va acidificando ligeramente (pH 5.8) lo que resulta en la protonación de los grupos amino libres que son capaces de interactuar con las cargas negativas de la membrana de la célula microbiana produciendo así cambios en la permeabilidad del agua vinculante y trazas de metales (Devlieghere *et al*, 2004).

# CONCLUSIONES

Se preparó y caracterizó quitosano a partir de quitina obtenida por método biológico preservando su estructura cristalina que es muy importante en las aplicaciones biológicas, además de tener la calidad para ser utilizado en aplicaciones biomédicas.

Con el quitosano se prepararon tres diferentes materiales por policondensación y polimerización por apertura de anillo. Siendo el material preparado por policondensación pero con catalizador con el que se obtuvo una mayor incorporación de unidades de ácido láctico (QPAL), seguido el compuesto preparado por polimerización por apertura de anillo (QPAL) y por último, el compuesto preparado por policondensación pero sin catalizador (QAL); lográndose en los tres materiales la unión de PLA en los grupos amino del quitosano.

Comparando entre sí, los materiales con un mayor porcentaje de incorporación presentaron buenas propiedades mecánicas pero son menos termoestables y con arreglo mas amorfo, por otro lado los materiales con baja incorporación preservaron su estructura cristalina haciéndolos más termoestables pero con bajas propiedades mecánicas.

El material preparado por policondensación QAL permitió la adhesión y viabilidad de los fibroblastos mientras que los materiales QPAL preparado por policondensación pero con catalizador y QPLA preparado por PAA no presentaron adhesión celular. Por otro lado, los tres materiales inhibieron hasta en un 75 % el crecimiento de la bacteria *P. aeruginosa* conservando sus propiedad microbiana aun después del injerto del PLA.

# Bibliografía

- A.O.A.C. (1980). *Official Methods of Analyses of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Agnihotri, S., & Aminabhavi, T. (2004). Controlled release of clozapine through chitosan microparticles prepared by a novel method. *J. Controlled Release*, *96*, 245–259.
- Albertsson, A., & Varma, I. (2003). Recent developments in ring opening polymerization of lactones for biomedical applications. *Biomacromolecules*, *4*, 1466 – 1486.
- Allan, C., & Hadwiger, L. (1979). The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Exp. Mycol.*, *30*, 49-54.
- Anderson, K., & Hillmyer, M. (2006). Melt preparation and nucleation efficiency of polylactide stereocomplex crystallites. *Polym.*, *47*, 2030 – 2035.
- ASTMD618-00. (2003). Standar practice for conditioning plastics for testing.
- ASTMD882-97. (2003). Standar test method for tensile properties of thin plastic sheeting.
- Auras, R., Harte, B., & Selke, S. (2004). An overview of polylactides as packaging materials. *Macromol. Biosci.*, *4*, 835–864.
- Avérous, L. (2004). Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: a review. *J. Macromol. Sci. Polym. Rev.*, *C4(3)*, 231-274.
- Avérous, L. (2008). Polylactic Acid: Synthesis, Properties and Applications. En M. Naceur Belgacem, & A. Gandini, *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources* (págs. 433-450). Great Britain: ELSEVIER.
- Beaney, P., Lizardi-Mendoz, J., & Healy, M. (2005). Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, *80*, 145-150.
- Bhaskar, N., Suresh, P., Sakhare, P., & Sachindra, N. (2007). Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus ácidolactici* CFR2182: optimization of fermetation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteination/demineralization and carotenoid recovery. *Enzyme Microb. Technol.*, *40*, 1427–1434.
- Binias, D., Boryniec, S., & Binias, W. (2005). Fibres and textiles in Eastern Europe. *13*, 137-140.
- Blackwell, J., & Weih, M. (1980). Structure of protein chitin complexes: ovipositor of the ichneumon fly *Megarrhyssa*. *J. Mol. Biol.*, *137*, 49-60.

- Bustos, R., Romo, C., & Healy, M. (1994). Stabilisation of Trypsin-Like Enzymes from Antarctic Krill: Effect of Polyols, Polysaccharides and Proteins. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 65, 193-199.
- Carothers, H., Dorough, G., & Van Natta, F. (1932). The reversible polymerization of six membered cyclic esters. *J. Amer. Chem. Soc.*, 54, 761 – 772.
- Cartier, L., Okihara, T., Ikada, Y., Tsuji, H., Puiggali, J., & Lotz, B. (2000). Epitaxial crystallization and crystalline polymorphism of polylactides. *Polym.*, 41, 8909 – 8919.
- Chabot, F., Vert, M., Chapelle, S., & Granger, P. (1983). Configurational structures of lactic acid stereocopolymers as determined by <sup>13</sup>C–<sup>1</sup>H N.M.R. *Polym.*, 24, 53 – 59.
- Chen, T., Embree, H., Brown, E., Taylor, M., & Payne, G. (2003). Enzyme-catalyzed gel formation of gelatin and chitosan: potential for in situ applications. *Biomaterials.*, 24, 2831–2841.
- Chen, X., McCarthy, S., & Gross, R. (1997). Synthesis and Characterization of [l]-Lactide–Ethylene Oxide Multiblock Copolymers. *Macromolecules.*, 30, 4295–4301.
- Cheng, Y., Deng, S., Chen, P., & Ruan, R. (2009). Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: a review. *Front. Chem. in China*, 4(3), 259-264.
- Cira, L., Huerta, S., Hall, G., & Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochem.*, 37, 1359–1366.
- Degim, Z., Celebi, N., Sayan, H., Babul, A., & Erdogan, D. (2002). An investigation on skin wound healing in mice with a taurine-chitosan gel formulation. *Amino acids*, 22, 187-198.
- Depan, D., Kumar, A., & Singh, R. (2006). Preparation and characterization of novel hybrid of chitosan-g-lactic acid and montmorillonite. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 372-382.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, V. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiol.*, 21, 703–714.
- Ding, Z., Chen, J., Gao, S., Chang, J., & Zhang, J. (2004). Immobilization of chitosan onto poly-l-lactic acid film surface by plasma graft polymerization to control the morphology of fibroblast and liver cells. *Biomaterials.*, 25, 1059–1067.
- Doi, Y., & Steinbüchel, A. (2002). *Biopolymers, Applications and Commercial Products – Polyesters III*. Weiheim –Germany: Wiley-VCH.

- Domard, A. (1989). Physicochemical properties of chitinous materials. *Adv. in chitin Sci.*, 3, 24-37.
- Dormish, M., & Kaplan, D. (2004). Regulatory aspects and standardization of chitin and chitosan. *Adv. In Chitin Sci.*, 7, 152-156.
- Drumright, R., Gruber, P., & Helton, D. (2000). Polylactic Acid Technology. *Adv. Mater.*, 12, 1841-1846.
- Du, Y., Lemstra, P., Nijenhuis, A., Van Aert, H., & Bastiaansen, C. (1995). ABA type copolymers of lactide with poly(ethylene glycol). Kinetic, mechanistic, and model studies. *Macromolecules*, 28, 2124 – 2132.
- Duarte De Hollanda, H., & Netto, F. (2006). Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. *Food Chem. Toxicol.*, 71, 298-303.
- Duarte, M., Ferreira, M., Marvao, M., & Rocha, J. (2002). An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *Int. J. of Biol. Macromol.*, 31, 1-8.
- Dubois, P., Jacobs, C., Jerome, R., & Teyssie, P. (1991). Macromolecular engineering of polylactones and polylactides. 4. Mechanism and kinetics of lactide homopolymerization by aluminum isopropoxide. *Macromolecules*, 24, 2266 – 2270.
- Dumitriu, S. (2002). *Polysaccharides as biomaterials, in Polymeric Biomaterials*. New York: Dumitriu S. Marcel Dekker.
- Estupiñán, H., Parada, D., Laverde, D., Yesid, D., Peña, B., & Vázquez, C. (2007). Obtención de ácido poli(L-Láctico) mediante policondensación con catalizador de zinc metálico. *Scientia Et Technica*, 13, 267-272.
- F2103-01, D. (2008). Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Product Applications. . United States: American Society for Testing and Materials International.
- F2260-03, D. (2008). Standard Test Method for Determining Degree of Deacetylation in Chitosan Salts by Proton Nuclear Magnetic Resonance (<sup>1</sup>H NMR) Spectroscopy1 . United States: American Society for Testing and Materials International.
- F2602-08e1., D. (2008). Standard Test Method for Determining the Molar Mass of Chitosan and Chitosan Salts by Size Exclusion Chromatography with Multi-angle Light Scattering Detection (SEC-MALS). . United State: American Society for Testing and Materials Int.
- Felse, P., & Panda, T. (1999). Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioprocess Eng.*, 20, 505-512.

- Fitzgerald, R. W. (1990). *Mecanica de materiales*. México: Alfaomega.
- Garlotta, D. (2002). Literature Review of Poly(Lactic Acid),. *J. Polym. Environ.*, 63-84.
- Geremia, R., & Rinaudo, M. (2005). Biosynthesis, structure, and physical properties of some bacterial polysaccharides, in *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*. En S. D. Dimeritriu. New York.
- Gilding, D., & Reed, A. (1979). Biodegradable polymers for use in surgery – Polyglycolic/poly(lactic acid) homo-and copolymers. *Polymer*, 20, 1459 – 1464.
- Gimeno, M., Ramírez, J., Martínez, C., Pacheco, N., García, R., Bázquez, E., & Shirai, K. (2007). One-Solvent Extraction of Astaxanthin from Lactic Acid Fermented Shrimp Wastes. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 10345-10350.
- Gontar, N., Guilbert, S., & Cuq, J. (1993). Water and glicerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier. Properties of an edible wheat gluten film. *J. Food Sc.*, 58, 206-211.
- Griesbach, U., Panzer, C., & Wachter, R. (1999). Chitosan: a cationic biopolymer for hair styling, care and protection. *Cosmet Toiletries*, 114, 81-83.
- Gunatillake, P., & Adhikari, R. (2003). Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering. *Eur. Cells Mater.*, 5, 1-16.
- Gupta, M., & Deshmukh, V. (1983). Radiation effects on poly(lactic acid). *Polymer*, 24, 827 – 830.
- Hadwiger LA., F. B. (1984). Chitosan, a natural regulator in plant-fungal pathogen interactions, increases crop yields. . En J. Zikakis, & F. Orlando, *Chitin, Chitosan, and Related Enzymes* (págs. 291–302). Academic Press.
- Hartmann, H. (1998). High molecular weight polylactic acid polymers. En D. Kaplan, *Biopolymers from Renewable Resources* (1a. ed., págs. 367 – 411). Berlin: Springer-Verlag.
- Hassan, M., Fadel, S., El-Wakil, N., & Oksman, K. (2012). Chitosan/Rice Straw Nanofibers Nanocomposites: Preparation, Mechanical, and Dynamic Thermomechanical Properties. *J. Appl. Poly. Sci.*, 125, E216–E222.
- He, Q., Ao, Q., Gong, Y., & Zhang, X. (2011). Preparation of chitosan films using different neutralizing solutions to improve endothelial cell compatibility. *J. Mater. Sci- Mater Med.*, 22, 2791–2802.
- Hejazi, R., & Amiji, M. (2002). Chitosan-based delivery systems: physicochemical properties and pharmaceutical applications. En S. M. Dumitriu, *Polymeric Biomaterials* (págs. 213–237). New York.

- Heux, L., Brugnerotto, J., Desbrières, J., Vrsali, M., & Rianudo, M. (2000). Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromolecules*, 1, 746-751.
- Hiltunen, K., Harkonen, M., Seppala, J., & Vaanane, T. (1996). Synthesis and characterization of lactic acid based telechelic prepolymers. *Macromolecules*, 29, 8677 – 8682.
- Hiltunen, K., Seppala, J., & Harkonen, M. (1997). Lactic acid based poly(ester-urethanes): Use of hydroxyl terminated prepolymer in urethane synthesis. *J. Appl. Polym. Sci.* 63, 1091 – 1100.
- Hirai, A., Odani, H., & Nakajima, A. (1991). Determination of degree of deacetylation of chitosan by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Polym. Bull.*, 26, 87-94.
- Hirano, S. (1999). Chitin and Chitosan as novel biotechnological materials. *Polym. Int.*, 48, 732-734.
- Hirano, S., Yoshida, S., & Takabuchi, N. (1993). N-[<sup>13</sup>CO] Acetylchitosan and its digestibility by silkworms. *Carbohydr. Polym.*, 22, 137-140.
- Hoogsten, W., Postema, A., Pennings, A., Brink, G., & Zugenmair, P. (1990). Crystal structure, conformation and morphology of solution-spun poly(L-lactide) fibres. *Macromolecules*, 23, 634 – 642.
- Hsu, S., Don, T., & Chiu, W. (2002). Synthesis of Chitosan-Modified Poly(methyl methacrylate) by Emulsion Polymerization. *J. Appl. Polym. Sci.*, 86, 3047-3056.
- Hutchinson, M., Dorgan, J., Knauss, D., & Hait, S. (2006). Optical Properties of Polylactides. *J. Polym. Environ.*, 14, 119-124.
- Hwang, K., Jung, S., Less, G., Chinnan, M., & Park, Y. (2002). Controlling Molecular Weight and Degree of Deacetylation of Chitosan by Response Surface Methodology. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1876–1882.
- Ikada, Y., & Tsuji, H. (2000). Biodegradable polyesters for medical and environmental applications. *Macromol. Rapid. Commun.*, 21, 117–132.
- Illum, L., & Davis, S. (2005). Chitosan as a delivery system for the transmucosal administration of drugs, in Polysaccharides. En S. M. Dumitriu, *Structural Diversity and Functional Versatility* (2a ed., págs. 643–660). New York.
- Invitrogen. (2005). LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit \*for mammalian cells\*. *Product Information*, 1-7.
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Reis, R., & Mano, J. (2005). Graft copolymerized chitosan-present status and applications. *Carbohydr. Polym.*, 62, 142–158.



- Juárez, C. (2010). Estudio del uso de enzimas comerciales en la preparación de quitina a partir de los desperdicios de camarón. *UAM-I.*, 14-51.
- Jun, C. (2000). Reactive blending of biodegradable polymers: PLA and starch. *J. Polym. Environ.*, 8, 33-37.
- Kafetzopoulos, D., Thireos, G., Vournakis, J., & Bouriotis, V. (1993). The primary structure of a fungal chitin deacetylase reveals the function for two bacterial gene products. *Proc. N. Academy Sci.*, 90, 8005-8008.
- Khor, E., & Lim, L. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials.*, 24, 2339–49.
- Kim, J., Ha, C., & Jo, N. (2002). Synthesis and properties of biodegradable chitin-graft-poly(L-lactide) copolymers. *Polym. Int.*, 51, 1123.
- Kricheldorf, H., & Sumbel, M. (1989). Polymerization of L, L -lactide with tin(II) and tin(IV) halogenides. *Eur. Polym. J.*, 25, 585 – 591 .
- Kumar, M. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.*, 46, 1-27.
- Kurcok, P., Matuszowicz, A., Jedlinski, Z., Kricheldorf, H., Dubois, P., & Jerome, R. (1995). Substituent effect in anionic polymerization of  $\epsilon$ -lactones initiated by alkali metal alkoxides. *Macromol. Rapid Commun.*, 16, 513 – 519.
- Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustacean (mini-review). *Mar. Biotechnol.* , 8, 203-226.
- Kurita, K., Sannan, T., & Iwakura, Y. (1977). Preparation of pure chitin, poly(N-acetyl-D-Glucosamine), from the water-soluble chitin. *Macromol. Chem.*, 178, 2595-2602.
- Lamarque, G., Viton, C., & Domard, A. (2005). New Route of Deacetylation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Chitins by Means of Freeze–Pump Out–Thaw Cycles. *Biomacromolecules.*, 6, 1380–1388.
- Li, G., Zhuang, Y., Mu, Q., Wang, M., & Fang, Y. (2008). Preparation, characterization and aggregation behavior of amphiphilic chitosan derivative having poly (L-lactic acid) side chains. *Carbohydr. Polym.*, 72, 60–66.
- Li, J., Kong, M., Cheng, J., Li, J., Liu, F., & Chen, X. (2011). A facile method for preparing biodegradable chitosan derivatives with low grafting degree of poly (lactic acid). *Inter. J. Biol. Macromol.*, 49, 1016-1021.
- Lim, L., Auras, R., & Rubino, M. (2008). Processing technologies for poly (lactic acid). *Prog. Polym. Sci.*, 33, 820–852.
- Liu, Y., Tian, F., & Hu, K. (2004). Synthesis and characterization of a brush-like copolymer of polylactide grafted onto chitosan. *Carbohydr. Res.*, 339, 845–851.

- Llames, S., García, E., García, V., Del Río, M., Larchar, F., Jorcano, J., Meana, A. (2006). Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell and Tissue Banking*, 7, 47-53.
- Lu, L., Peter, S., Lyman, M., Lai, H., Leite, S., & Tamada, J. (2000). In vitro degradation of porous poly(L-lactic acid) foams. *Biomaterials.*, 21, 1595-605.
- Mao, S., Augsten, C., Mäder, K., & Kissel, T. (2007). Characterization of chitosan and its derivatives using asymmetrical flow field-flow-fractionation: A comparison with traditional methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 45, 736-741.
- Martin, O., & Avérous, L. (2001). Poly(lactic acid): Plasticization and properties of biodegradable multiphase systems. *Polymer*, 42, 6237 – 6247.
- Marx, J., Singer, A., Taira, B., Lee, C., & Soroff, H. (2002). *Rosen's Emergency Medicine: Concepts and Clinical Practice*. Portland, USA: Book News, Inc.
- Mazo, P., Ríos, L., & Restrepo, G. (2011). Síntesis de poli ácido láctico y poli ricinoleato empleando calentamiento por microondas y su utilización en la producción de termoplásticos de poliuretano. *Polímeros: Ciencia y Tecnología*, 21, 83-89.
- Meana, A., Iglesias, J., Del Rio, M., Larcher, F., Madrigal, S., Fresno, M., . . . Tevar, F. (1998). Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns*, 24, 621-630.
- Metha, R., Kumar, V., Bhunia, H., & Upadhyay, S. (2005). Synthesis of Poly(lactic Acid): A Review, Parte C: polyme Reviews. *J. Micromol. Sci.*, 45, 235-349.
- Milas, M., & Rinaudo, M. (2005). Characterization and properties of hyaluronic acid (hyaluronan), in Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. En M. D. Dimitriu S.. New York.
- Minami, S., Raj, K., Miyatake, K., Okamoto, Y., & Ohta, H. (2001). Biological effect of chitosan-lactose mixture and its clinical applications. *Chitin chitosan Res.*, 7, 268-272.
- Minke, R., & Blackwell, J. (1978). Structure of Alpha-Chitin. *J. Mol. Biol.*, 120, 167-181.
- Muzzarelli, R. (1973). Natural Chelating Polymers, alginic acid, chitin and chitosan. New York, Oxford: Pergamon Press.
- Nagyvary, J., Falk, J., Hill, M., Schmidt, M., Wilkins, A., & Bradbury, E. (1979). The hypolipidemic activity of chitosan and others polysaccharides in rats. *Nutr. Rep. Int.*, 20, 677-684.
- Nemtsev, S., Gamzazade, A., Rogozhin, S., Bykova, V., & Bykov, V. (2002). Deacetylation of chitin under homogeneous conditions. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 38, 521-526.

- Nishimura, S. (2001). Chemical biology and biomedicine: general aspects. En B. Fraser-Reid, K. Tastuta, & J. Thiem, *Glycosciences: Chemistry and chemical Biology*. New York: Springer.
- Pacheco, N. (2010). Extracción Biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: caracterización y aplicaciones. México D.F.: Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.
- Pacheco, N., Garnica-González, M., Ramírez-Hernández, J. Y., Flores-Albino, B., Gimeno, M., Bárzana, E., & Shirai, K. (2009). Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresour. Technol.*, *100*, 2849-2854.
- Pacheco, N., Garnica-Gonzalez, M., Gimeno, M., Barzana, E., Trombotto, S., David, L., & Shirai, K. (2011). Structural Characterization of Chitin and Chitosan Obtained by Biological and Chemical Methods. *Biomacromolecules*, *12*, 3285–3290.
- Pacheco, N., Larralde-Corona, P., Sepúlveda, J., Trombotto, S., Domard, A., & Shirai, K. (2008). EVALUATION OF CHITOSANS AND *Pichia guillermondii* AS GROWTH INHIBITORS OF *Penicillium digitatum*. *Inter. J. Biol. Macromol.*, *43*, 20-26.
- Pastor, A. (2004). Generalidades de Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo editorial.
- Pellegrini, G., Ranno, R., Stracuzzi, G., Bondanza, S., Guerra, L., Zambruno, G., . . . De Luca, M. (1999). The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin. *Transplantation*, *68*, 868-879.
- Percot, A., Viton, C., & Domard, A. (2003). Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromolecules.*, *4*, 12–18.
- Perepelkin, K. (2002). Polylactides fibres: fabrication, properties, use, prospects: a review. *Fiber Chem.*, *34*, 63-84.
- Perrin, D., & English, J. (1997). Polyglycolide and polylactide. En A. Domb, J. Kost, & D. Wiseman, *Handbook of Biodegradable Polymers*. (págs. 3–25). Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Peschel, G., Dahse, H., Konrad, A., Wieland, G., Muller, P., Martin, P., & Roth, M. (2007). Growth of keratinocytes on porous films of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(4-hydroxybutyrate) blended with hyaluronic acid and chitosan. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 1072-1081.
- Plascencia, M., Viniegra, G., Olayo, R., & Castillo, M. (2003). Effect of Chitosan and Temperature on Spore Germination of *Aspergillus niger*. *Macromol. Biosci.*, *3*, 582–586.

- Prashanth, K., & Tharanathan, R. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential – an overview. *Trends Food Sci. Technol.*, *18*, 117-131.
- Qu, X., Wirsen, A., & Albertsson, A. (1999). Structural change and swelling mechanism of pH-sensitive hydrogels based on chitosan and D,L-lactic acid. *J. Appl Polym. Sci.*, *74*, 3186-3193.
- Rabea, E., Badawy, M., Stevens, C., Smaghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action . *Biomacromolecules*, *4*, 1457–1465.
- Ramakrishna, S., Mayer, J., Wintermantel, E., & Leong, K. (2001). Biomedical applications of polymer-composite materials: A review. *Compos. Sci. Technol.*, *61*, 1189 – 1224.
- Rao, M., Muñoz, J., & Stevens, W. (2000). Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Appl. Microbiol. Biotech.*, *54*, 808–813.
- Rasal, R., Janorkar, A., & Hirt, D. (2010). Poly (lactic acid) modifications. *Prog. Polym Sci.*, *35*, 338–356.
- Ravi Kumar, M., Muzzarelli, R., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., & Domb, A. (2004). Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chem Rev.*, *104*, 6017-6084.
- Rinaudo, M. (1993). Gelation of polysaccharides. *J. Intell. Mater. Syst. Struct.*, *4*, 210-215.
- Rinaudo, M. (2006a). Characterization and properties of some polysaccharides used as biomaterials. *Macromol. Symp.*, *245*, 549-557.
- Rinaudo, M. (2006b). Non-covalent interactions in polysaccharide systems. *Macromol. Biosci.*, *6*, 590-610.
- Rinaudo, M. (2006c). Polysaccharides. En *Encyclopedia of Chemical Technology* (5 ed., Vol. 20, págs. 549–586). John Wiley.
- Rinaudo, M. (2006d). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym Sci.*, *31*, 603-632.
- Rinaudo, M. (2007). Properties and degradation of selected polysaccharides: hyaluronan and chitosan. *Corros. Eng. Sci. Technol.*, *42*, 324-334.
- Rinaudo, M., Auzely, R., & Mazeau, K. (2004). Polysaccharides and carbohydrate polymers. En *Encyclopedia of Polymer Science and Technology* (Vol. 11, págs. 200–261). New York: John Wiley.
- Rudrapatnan, N., Tharanathan, & Farooqahmed, S. (2003). Chitin — The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Crit. Rev. Food Sci.*, *43*, 61-87.

- Rutherford, F., & Austin, P. (1978). Marine chitin properties and solvents. eds. En R. Muzzarelli, & E. Pariser. In: Proceedings of the first Int. Conference on chitin /chitosan.
- Sarazin, P., Roy, X., & Favis, B. (2004). Controlled preparation and properties of porous poly(L-lactide) obtained from a co-continuous blend of two biodegradable polymers. *Biomaterials.*, 25, 5965–78.
- Schwach, E. (2004). *Etude de systèmes multiphasés biodegradables à base d' amidon de blé plastifié. Relations structure –propriétés. Approche de la compatibilisation Ph.D Thesis.* Reims- France: URCA.
- Schwach, G., Coudane, J., Engel, R., & Vert, M. (1994). Stannous octoate-versus zinc-initiated polymerization of racemic lactide ., *Polym. Bull.*, 32 , 617 – 623.
- Shahidi, F., & Abuzaytoun, R. (2005). Chitin, chitosan, and co-products:chemistry production applications and health effects. *Adv. Food Nutrition Res.*, 49, 93-135.
- Shahidi, F., Arachchi, J., & Jeon, Y. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Technol.*, 10, 37–51.
- Shi, C., Zhu, Y., Ran, X., Wang, M., Su, Y., & Cheng, T. (2006). Therapeutic potencial of chitosan and its derivates in regenerative medicine. *J. Surg. Res.*, 133, 185- 192.
- Shirai, K., Guerrero, I., & Hall, G. (1996). Quitina: Ocurrencia, propiedades y aplicaciones. *Ciencia*, 47, 317-328.
- Shirai, K., Plascencia, M., Cira, L., & Huerta, S. (2000). Patente Mexicana. *IMPI No. 247295.*, Clasificación Int. Cl.8:A23J1/04; C08B37/08; C22B26/20.
- Shrinivas, M., & Stevens, W. (2005). Chitin production by Lactobacillus fermentation of shirimp in a drum reactor and its chemical conversión to chitosan. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80, 1080-1087.
- Sini, T., Santhosh, S., & Mathew, P. (2007). Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using Bacillus subtilis fermentation. *Carbohydr. Res.*, 347, 2423-2429.
- Sodergard, A., & Stolt, M. (2002). Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Prog. Polym. Sci.*, 27, 1123 – 1163.
- Sothornvit, R., & Krochta, J. (2000). Oxygen permeability and mechanical properties of films from hydrolyzed whey protein. *J. Agric.Food Chem.*, 48, 3913-3916.
- Stawski, D., Rabiej, S., Herczynska, L., & Draczynski, Z. (2008). Thermogravimetric analysis of chitins of different origen. *J. Therm. Anal.Calorim.*, 93, 489-494.
- Stolt, M., & Sodergard, A. (1999). Use of monocarboxylic iron derivatives in the ring-opening polymerization of l -lactide ., *Macromolecules*, 32 (20), 6412 – 6417.

- Stridsberg, K., Ryner, M., & Albertsson, A. (2001). Controlled ring-opening polymerization: Polymers with designed macromolecular architecture. *Adv. Polym. Sci.*, 157, 41 – 65.
- Suh, J., & Matthew, H. (2000). Application of chitosan-based polysaccharide biomateriales in c engineering: a review. *Biomaterials.*, 21, 2589-2598.
- Suyatma, N., Copinet, A., Copinet, E., Fricoteaux, F., & Coma, V. (2010). Different Pla Grafting Techniques on Chitosan. *J. Polym. Environ.*, 1-6.
- Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S., & Suzuki, M. (1986). Antitumor effect of hexa-N-Acetylchitogexaose and chitohexose. *Carbohydr. Res.*, 151, 403-408.
- Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit. Rev. Food Sci.*, 43, 145–171.
- Tamura, H., Hamaguchi, T., & Tokura, S. (2004). Destruction of rigid crystalline structure to prepare chitin solution. En J. K. Boucher I, *Adv. Chitin Sci.* (Vol. 7, págs. 84-87). Montreal.
- Teng, W., Khor, E., Tan, T., Lim, L., & Tan, S. (2001). Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydr. Res.*, 332, 305–316.
- Thanou, M., & Junginger, H. (2005). Pharmaceutical applications of chitosan and derivatives, in Polysaccharides. En S. M. Dumitriu, *Structural Diversity and Functional Versatility* (2a ed., págs. 661–677). New York.
- Tormala, P., Vasenius, J., Vainionpaa, S., Laiho, J., Pohjonen, T., & Rokkanen, P. (1991). Ultra-high-strength absorbable self-reinforced polyglycolide (SR-PGA) composite rods for internal fixation of bone fractures: In vitro and in vivo study. *J. Biomed. Mater. Res.*, 25, 1-22.
- Tsuji, H., & Ikada, Y. (1995). Properties and morphologies of poly( L-lactide): 1. Annealing effects on properties and morphologies of poly( L-lactide). *Polymer*, 36, 2709 – 2716.
- Tsuji, H., Cartier, L., Okihara, T., Lotz, B., Puiggali, J., & Ikada, Y. (2000). The frustrated structure of poly( L-lactide). *Polymer*, 41, 8921 – 8930.
- Uchida, Y., Izume, M., & Ohtakara, A. (1989). Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application. En G. Skjak-Bræk, T. Anthonsen, & P. Sandford, *Chitin and Chitosan* (págs. 373–382). Essex: Elsevier.
- Valdez, B., Schorr, M., Valdez, E., & Carrillo, M. (2005). Biomateriales para la rehabilitación del cuerpo humano. *Ciencia y Desarrollo*, 2-10.

- Vallerti, M., & Cormas, A. (2007). *Biomateriales: Repuestos para el cuerpo humano*. España: Real Academia de ingeniería.
- Wang, S., Cai, Q., Hou, J., Bei, J., Zhang, T., Yang, J., & col. (2003a). Acceleration effect of basic fibroblast growth factor on the regeneration of peripheral nerve through a 15-mm gap. *J. Biomed. Mater. Res.*, 66, 522–531.
- Wang, S., Cui, W., Li, G., Cai, Q., Zhi, G., & Zhao, Y. (2003b). Novel ultrasound contrast agents – biodegradable poly(lactic acid) microcapsules. *China Series B – Chemistry*, 46, 371–378.
- Wang, S., Yerf, Y., Tzeng, G., & Hsielf, C. (2005). Production of antifungal materials by bioconversion of shellfish chitin waste fermented by *Pseudomonas florecens* K-188. *Enzyme Microb. Technol.*, 36, 49-56.
- Wilks Verlag, G., & Weinheim. (2002). Industrial polymers handbook: Products, Processes, Applications Vol. 1, Polymerization processes: synthetic polymers Vol 2, Synthetic polymers Vol. 3, Synthetic polymers; biopolymers and their derivatives Vol 4, Biopolymers and their derivatives. *Polym. Int.*, 51, 264-265.
- Williams, C., Breyfogie, L., Choi, S., Nam, W., & Young, V. (2003). A highly active zinc catalyst for the controlled polymerization of lactide. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(37), 11350 – 11359.
- Xiao, Y., Li, D., Chen, X., Lu, J., Fan, H., & Zhang, X. (2008). Preparation and Cytocompatibility of Chitosan-Modified Polylactide. *J. Appl. Polym. Sci.*, 110, 408–412.
- Xie, D., Huang, H., Blackwood, K., & MacNeil, S. (2010). A novel route for the production of chitosan/poly(lactide-co-glycolide) graf copolymers for electrospinning. *Biomed. Mater.*, 5, 1-9.
- Yao, F., Chen, W., Wang, H., Liu, H., Yao, K., Sun, P., & Lin, H. (2003). A study on cytocompatible poly(chitosan-g-L-lactic acid). *Polymer.*, 44, 6435–6441.
- Yasuniwa, M., Tsubakihara, S., Sugimoto, Y., & Nakafuku, C. (2004). Thermal analysis of the double-melting behavior of poly( l-lactic acid). *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, 42 , 25 – 32.
- Zhang, J., & Sun, X. (2005). Poly(lactic acid)based bioplastics. En R. C. Smith, *Biodegradable polymers for industrial applications* (págs. 251 – 288). Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
- Zhang, Y., Xue, C., Li, Z., Zhang, Y., & Fu, X. (2006). Preparation of half-deacetylated chitosan by forced penetration and its properties. *Carbohid. Polym*, 65, 229-234.

# ANEXOS

A1. Composición de los medios, antibióticos y PBS usados en los cultivos celulares.

En la Tabla A1.1 se observa la composición del medio de cultivo DMEM/F12 la cual es un medio complejo con los nutrientes y factores de crecimiento necesario.

**Tabla A1.1** Composición del medio de cultivo DMEM/F12.<sup>1</sup>

Componentes	Peso Molecular	Concentración (mg/L)	mM
<b>Amino Ácidos</b>			
Glicina	75	30	0.4
L-Arginina hidrocloreto	211	84	0.398
L-Cistina 2HCl	313	63	0.201
L-Glutamina	146	584	4
L-Histidina hidrocloreto-H <sub>2</sub> O	210	42	0.2
L-Isoleucina	131	105	0.802
L-Leucina	131	105	0.802
L-Lisina hidrocloreto	183	146	0.798
L-Metionina	149	30	0.201
L-Fenilalanina	165	66	0.4
L-Serina	105	42	0.4
L-Treonina	119	95	0.798
L-Triptofano	204	16	0.0784
L-Tirosina sal disódica dihidratada	261	104	0.398
L-Valina	117	94	0.803
<b>Vitaminas</b>			
Cloruro de Colina	140	4	0.0286
D-Calcio pantotenato	477	4	0.00839
Ácido Fólico	441	4	0.00907
Niacinamida	122	4	0.0328
Piridoxina hidrocloreto	204	4	0.0196
Riboflavina	376	0.4	0.00106
Tiamina hidrocloreto	337	4	0.0119
i-Inositol	180	7.2	0.04
<b>Sales Inorgánica</b>			
Cloruro de Calcio (CaCl <sub>2</sub> ) (anhidro)	111	200	1.8
Nitrato Férrico (Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> 9H <sub>2</sub> O)	404	0.1	0.000248
Sulfato de Magnesio (MgSO <sub>4</sub> ) (anhidro)	120	97.67	0.814
Cloruro de Potasio (KCl)	75	400	5.33
Bicarbonato de Sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	84	3700	44.05
Cloruro de Sodio (NaCl)	58	6400	110.34
Fosfato de Sodio monobásico (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O)	138	125	0.906
<b>Otros Componentes</b>			
D-Glucosa (Dextrosa)	180	4500	25
Rojo Fenol	376.4	15	0.0399



En la Tabla A1.2 se observa la composición del antibiótico basado principalmente en los fármacos anfotericina B, estreptomina y penicilina. En la Tabla A1.3 se observa la composición de la solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS), como se observa la solución además de ser un amortiguador también actúa como una solución salina para mantener las condiciones osmóticas de las células constantes.

**Tabla A1.2.** Composición del antibiótico usado en las pruebas biológicas.<sup>2</sup>

<b>Formula:</b>	<b>Líquido</b>
<b>Agente:</b>	Amfotericina B, Penicilina, Estreptomina
<b>Concentración:</b>	100 X
<b>Tamaño de Producto:</b>	100 ml
<b>Tipo de Agente:</b>	Anti-Micótico, Antibiótico
<b>Aplicación Validada:</b>	Prevención de Contaminación de Cultivos Celulares
<b>Declaración Regulatoria:</b>	Use solo para investigación. No se use para terapia o diagnóstico de ningún animal o ser humano.

**Tabla A1.3** Composición de la solución amortiguadora de fosfatos (PBS).<sup>2</sup>

<b>Componentes</b>	<b>Peso Molecular</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>	<b>mM</b>
<b>Sales Inorgánicas</b>			
<b>Fosfato de Potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	136	1440	10.59
<b>Cloruro de Sodio (NaCl)</b>	58	90000	1551.72
<b>Fosfato de Sodio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O)</b>	268	7950	29.66

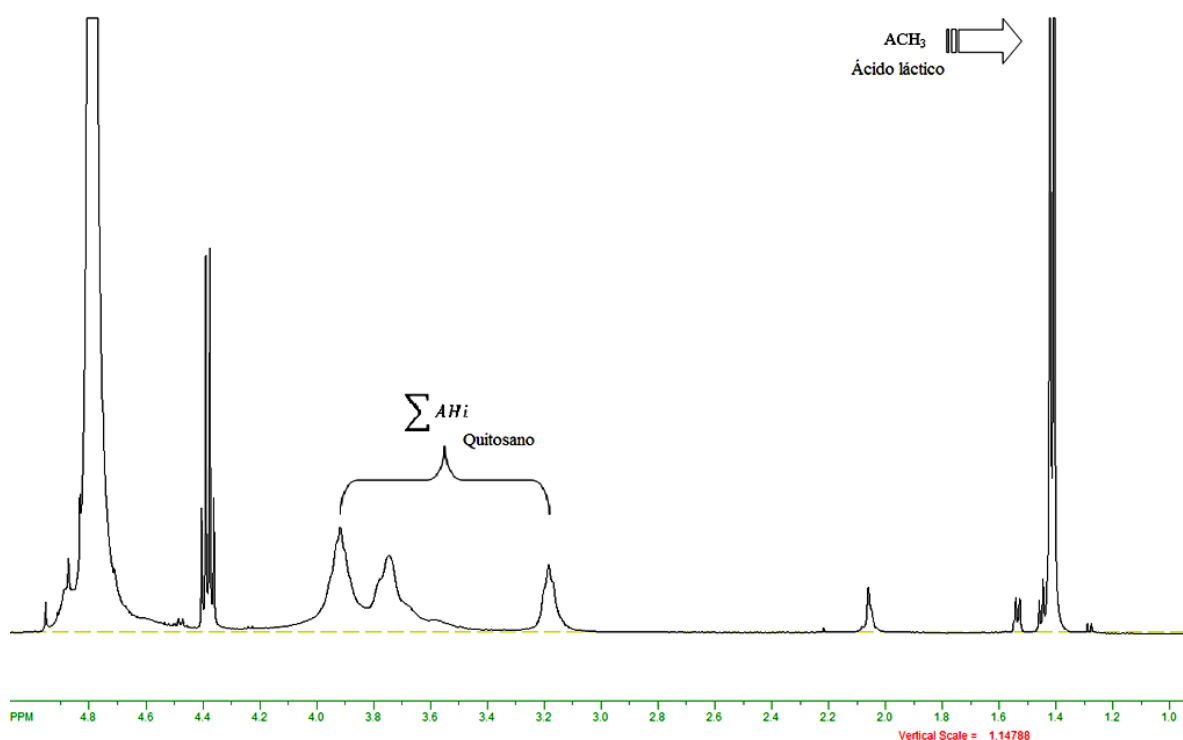
Y en la Tabla A1.4 se aprecia la composición del medio de cultivo Hanks el cual se utiliza en la preparación de las muestras para la prueba de viabilidad celular.

**Tabla A1.4** Composición del medio Hanks.<sup>3</sup>

<b>Componentes</b>	<b>Peso Molecular</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>	<b>mM</b>
<b>Sales Inorgánicas</b>			
<b>Cloruro de Calcio (CaCl<sub>2</sub>) (anhidro)</b>	111	140	1.26
<b>Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O)</b>	203	100	0.493
<b>Sulfato de Magnesio (MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O)</b>	246	100	0.407
<b>Cloruro de Potasio (KCl)</b>	75	400	5.33
<b>Fosfato de Potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	136	60	0.441
<b>Bicarbonato de Sodio (NaHCO<sub>3</sub>)</b>	84	350	4.17
<b>Cloruro de Sodio (NaCl)</b>	58	8000	137.93
<b>Fosfato de Sodio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) anhidro</b>	142	48	0.338
<b>Otros Componentes</b>			
<b>D-Glucosa (Dextrosa)</b>	180	1000	5.56

**A.2** Espectros complementarios del análisis de  $^1\text{H}$ -RMN, las cuales son: de los copolímeros QPAL y QPLA, y de las tres pruebas de purificación para el compuesto QAL, todos del quitosano C1.

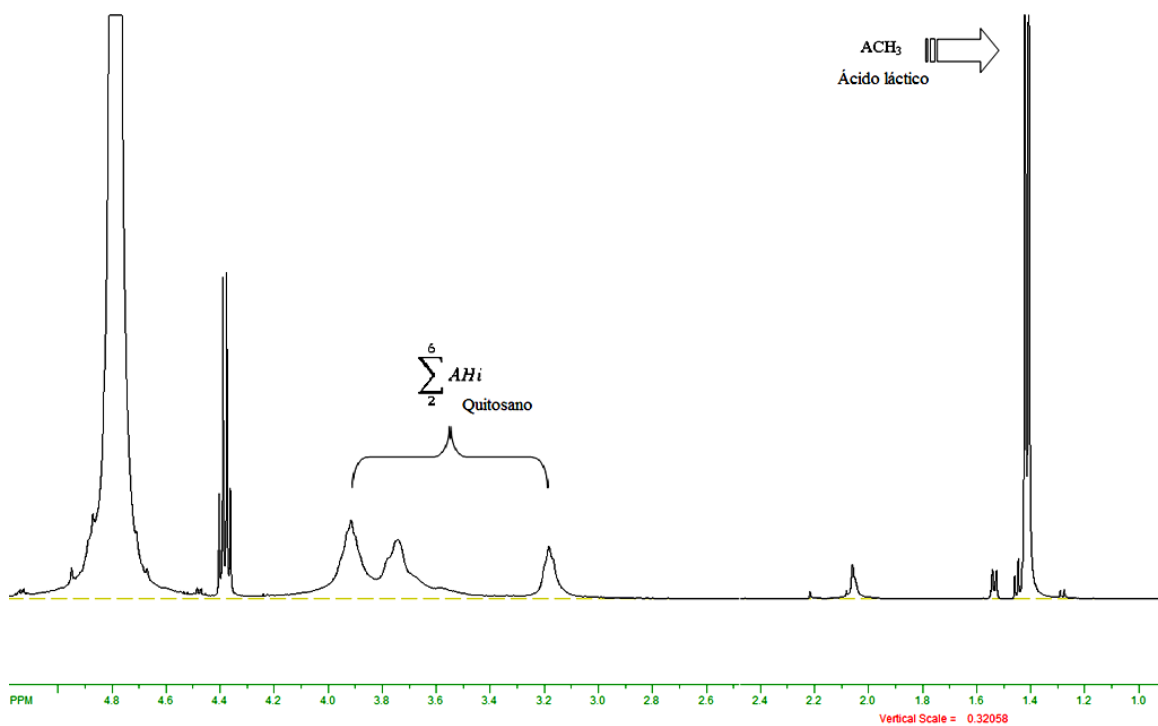
Entonces, en las Figura A2.1, A2.2 y A2.3 se observan los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto QAL obtenido en las diferentes técnicas de purificación con acetona. Los primeros 3 espectros, servirán de ejemplo para recordar cual son las bandas características de los compuestos nativos. Y los últimos espectros corresponden a los copolímeros QPAL y QPLA del quitosano C1, para corroborar que aparecen las bandas indicadas en los primeros espectros de  $^1\text{H}$ -RMN, comprobando la unión del ácido láctico y el quitosano en los diferentes materiales.



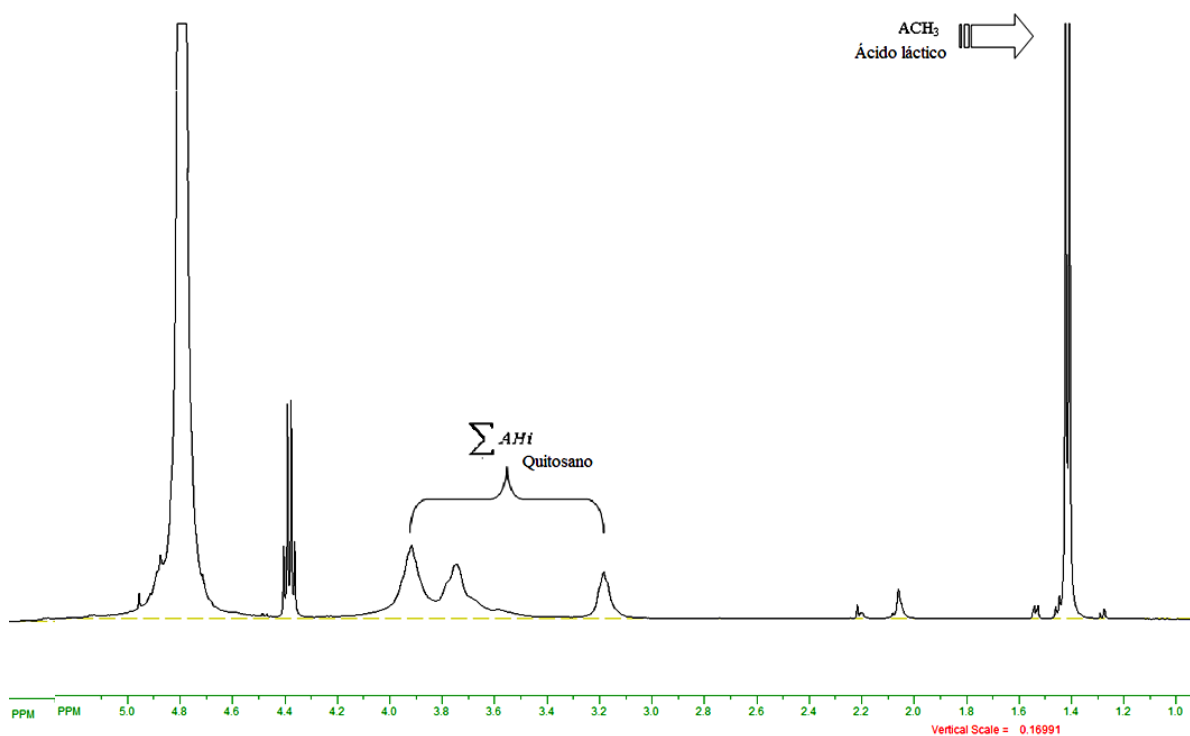
**Figura A2.1.** Espectro de H-RMN del copolímero QAL purificado por precipitación directa con acetona.

En las Figuras A2.4 y A2.5 se observan los espectros de los copolímeros QPAL y QPLA respectivamente, del quitosano C1.

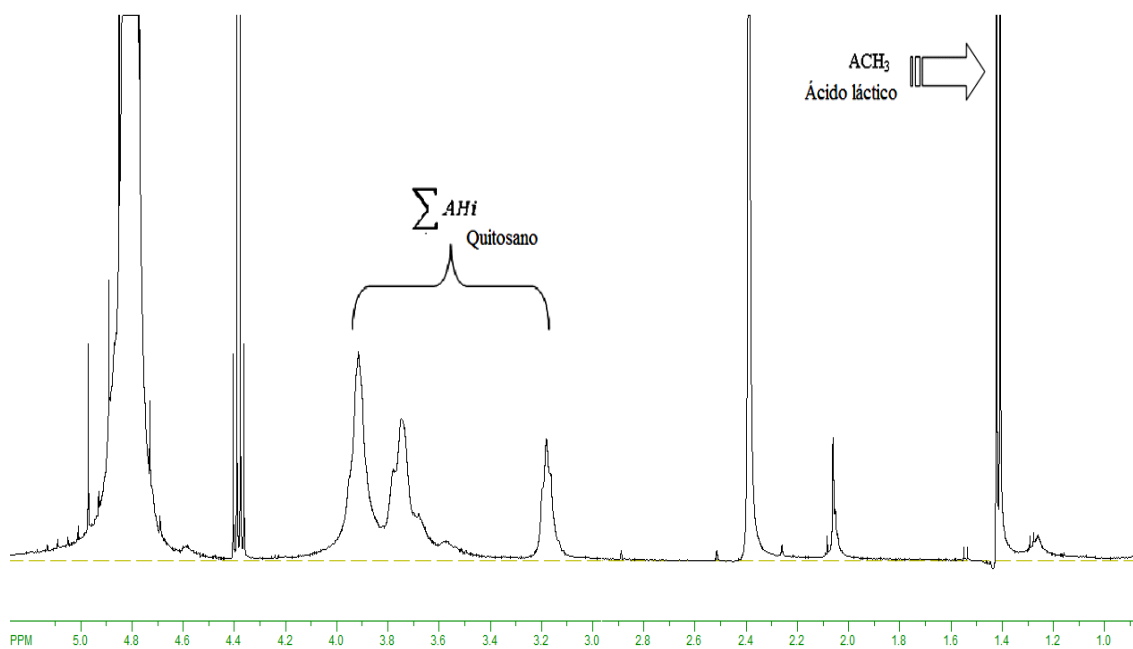
Los cuales son complementarios de la tesis y en los que se observan al igual que los anteriores las bandas características a 1,4 ppm la banda correspondiente a los protones del metilo del ácido láctico, mientras que los relacionados con el quitosano se observan los masivos A y B entre 3 y 4 ppm, con lo que corroboramos la unión del quitosano y los derivados de ácido láctico.



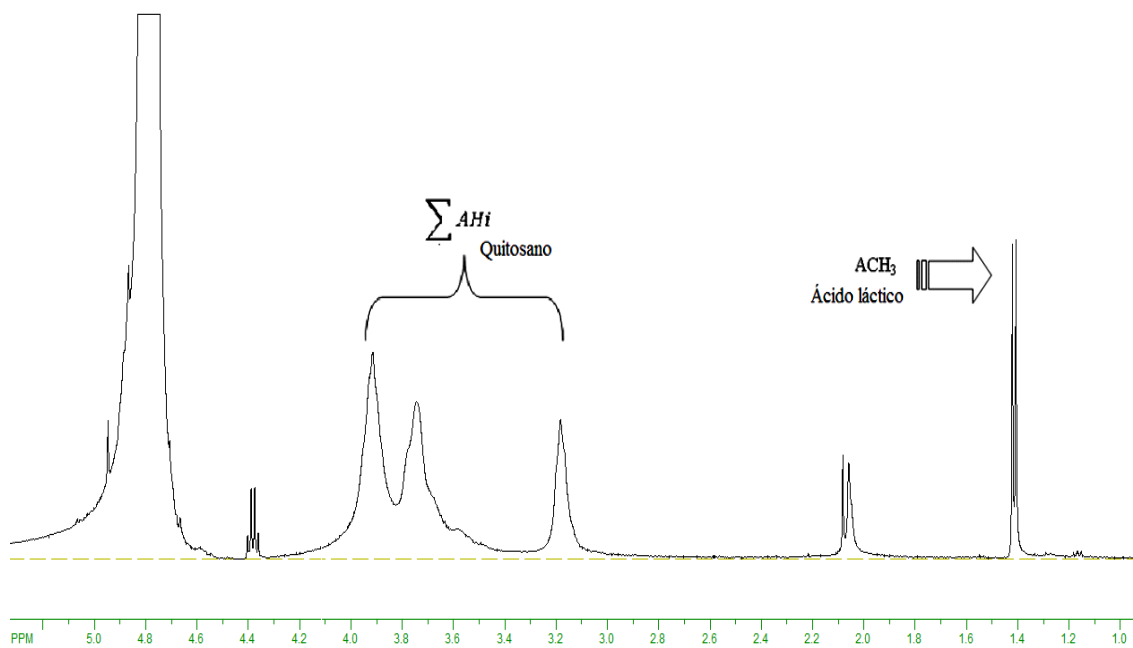
**Figura A2.2.** Espectro de H-RMN del copolímero QAL purificado por precipitación directa en frío con acetona.



**Figura A2.3.** Espectro de H-RMN del copolímero QAL purificado por precipitación por goteo en frío con acetona.



**Figura A2.4.** Espectro de H-RMN del copolímero QPLA del quitosano C1.

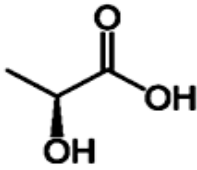


**Figura A2.5.** Espectro de H-RMN del copolímero QPLA del quitosano C1.

**A.3** Espectros complementarios y ejemplo de promedio del análisis de FTIR de los copolímeros. QPAL y QPLA y de las tres pruebas de purificación para el compuesto QAL del quitosano C1, y sus sobrenadantes.

En la Tabla A1.1 se resumen las bandas características del ácido láctico y recordando que las bandas más importantes fueron las correspondientes al grupo ceto y las flexiones simétricas de los enlaces de C-H del metilo del ácido láctico.

**Tabla A1.1** Bandas características de los grupos funcionales del espectro de AL.

Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional	Estructura del ácido láctico
3400.79	Grupos -OH	
2988.24 y 2940.47	Estiramientos -CH- alcano	
1718.50	Estiramiento C=O	
1455.06	Flexiones simétricas de los grupos CH	
1375.55	Flexiones simétricas de los grupos CH <sub>3</sub>	
1212.6 y 1121.46	Estiramiento de los enlaces C-O del grupo ácido y ester.	
1042.51	Enlaces C-CH <sub>3</sub>	

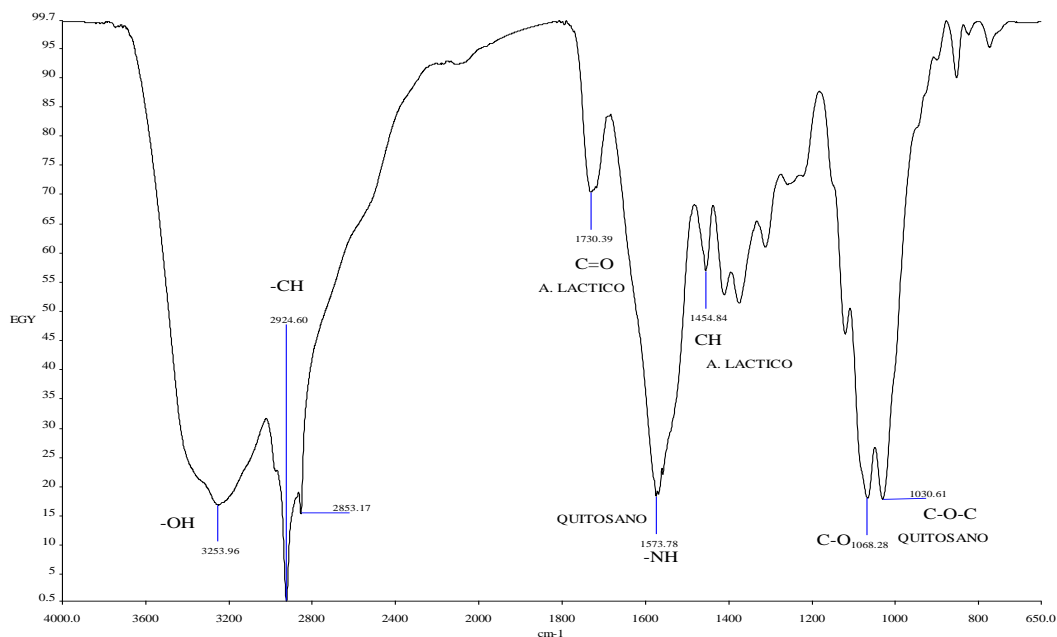
En la Figura A3.1 se muestra 4 espectros del copolímeros QAL los cuales fueron de las repeticiones de la técnica de precipitación directa en acetona, con ayuda de la herramienta “calcule” del programa “Spectrum” del ATR-FTIR se calculo un espectro promedio (espectro en color azul), así facilito la comparación entre el quitosano nativo y el ácido láctico nativo.



**Figura A3.1** Cálculo del espectro promedio de las repeticiones de la purificación directa en acetona del copolímero QAL.

Como se observa en la Figura A3.1 el espectro en azul esta en medio de los 4 espectros, así se obtuvo el espectro promedio de todos los compuestos.

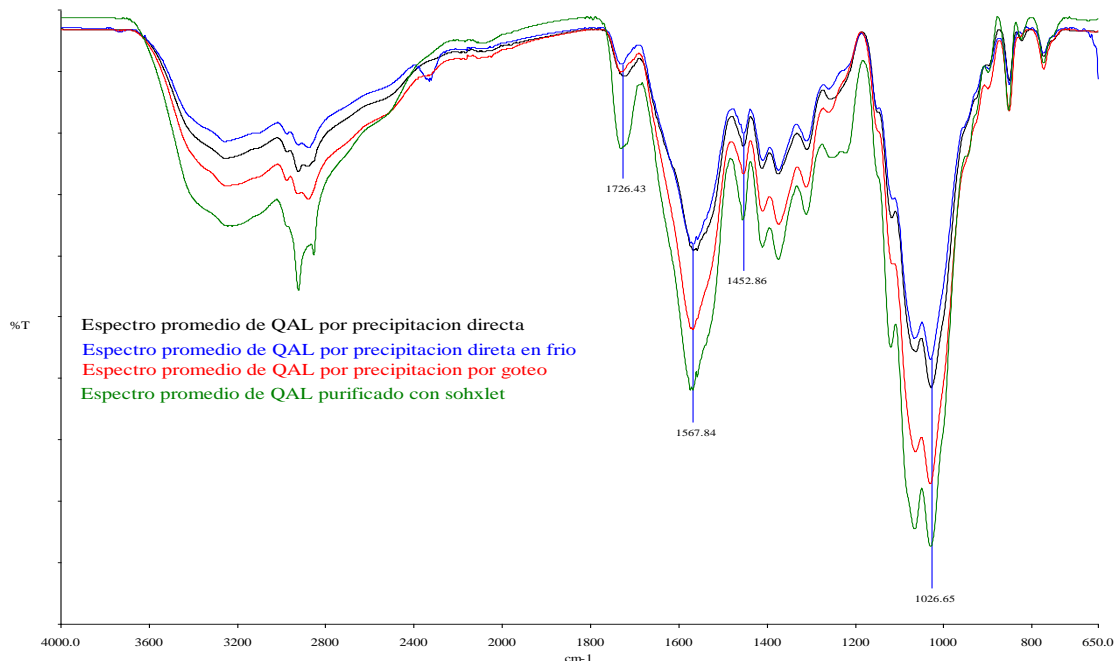
En la figura A3.2 se observa el espectro promedio de los copolímeros de QAL en la cual podemos identificar que presenta gran similitud con el espectro correspondiente al quitosano, como principales bandas confirmativas de este aparece en  $3353.9\text{ cm}^{-1}$  los grupos OH del polímero, las bandas en  $2924.6$  y  $2853.17\text{ cm}^{-1}$  que corresponden al grupo  $-\text{CH}$ , en  $1573.7\text{ cm}^{-1}$  los grupos  $-\text{NH}_2$ , en  $1068$  y  $1030.6$  aparecen las vibraciones del esqueleto de la estructura de quitosano, las cuales son indicativo de que la estructura del esqueleto no se altera durante la reacción de síntesis del copolímero. Evidencia de la unión entre el quitosano y el ácido láctico se tiene el ensanchamiento de la banda del grupo amino debido a su traslape con la de las aminas primarias y dos bandas nuevas característica en  $1730.3$  y  $1454.8\text{ cm}^{-1}$  que nos indica estiramiento del grupo carbonilo y flexiones simétricas de CH, proveniente de la incorporación de la molécula de ácido láctico, bandas similares reporta Qu *et al*, (1999) como indicio de la unión entre el quitosano y el ácido láctico.



**Figura A3.2.** Espectro de infrarrojo medio del quitosano- ácido láctico (C1) (QAL).

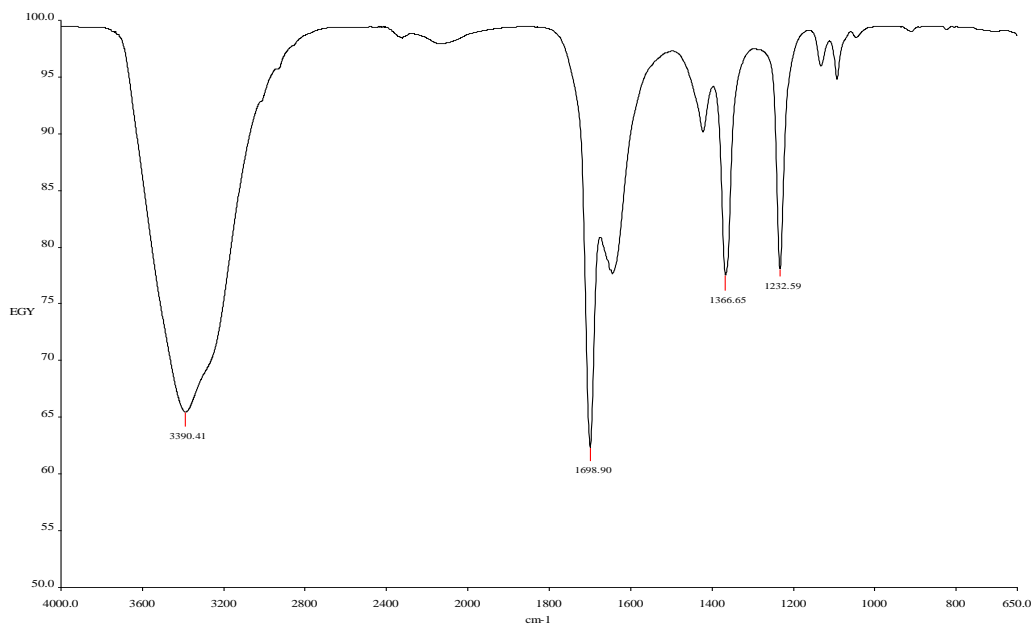
Haciendo uso de la herramienta se calcula los espectros promedio de cada una de las técnicas de purificación del copolímero QAL, las cuales se comparan en un solo espectro y con ayuda de la herramienta “compare” del programa del ATR-FTIR se tiene que los espectros son similares entre 95% (Figura A3.3).

Como se observa en la Figura A3.3 los compuestos son muy similares y las diferencias en transmitancia se debe a la preparación de la muestra, es decir los copolímeros QAL obtenidos con las técnicas de precipitación se analizaron como polvo debido al agregado que formaban, mientras que los purificados en Soxhlet se analizaron en forma de película, es evidente que el análisis de FTIR para estos materiales es mejor en película.



**Figura A3.3** Comparación de los espectros de QAL de las diferentes técnicas de purificación.

Como se menciona en la sección 6.4.4 a los sobrenadantes después de evaporarle la acetona, se analizaron y se calculo el promedio de estos, el cual se muestra en la Figura A3.4.

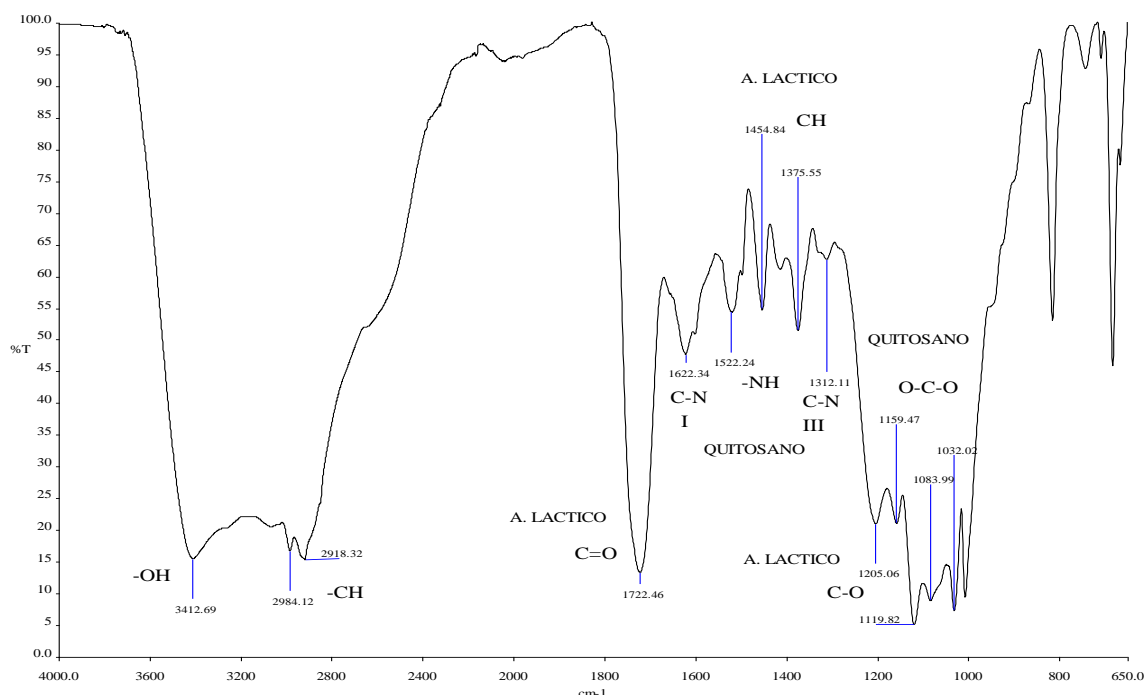


**Figura A3.4** Espectro promedio de los espectros de los sobrenadantes de las diferentes técnicas de purificación del copolímero QAL.

Al analizar la figura A3.4 se determina que el principal compuesto encontrado en los sobrenadantes es ácido láctico, debido a las bandas características que presenta, a 1698 la banda del grupo ceto, 1366 la banda correspondiente al metilo y 1232 estiramiento de los enlaces C-O de grupo ácido y éster.

En la Figura A3.5 se muestra el espectro promedio de los copolímeros QPAL del quitosano C1, en el cual se observa que presenta gran similitud con el espectro correspondiente al ácido láctico como principales bandas confirmativas se tiene: 3412.6  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento del grupo OH, 2984.1 y 2918.32  $\text{cm}^{-1}$  debido a estiramientos -CH- alcano, 1722.4  $\text{cm}^{-1}$  estiramiento del C=O, 1454.84 y 1375.5  $\text{cm}^{-1}$  flexiones simétricas de los grupos CH y  $\text{CH}_3$ , 1205.06 y 1119.8  $\text{cm}^{-1}$  estiramientos de -C-O- del grupo ácido y éster.

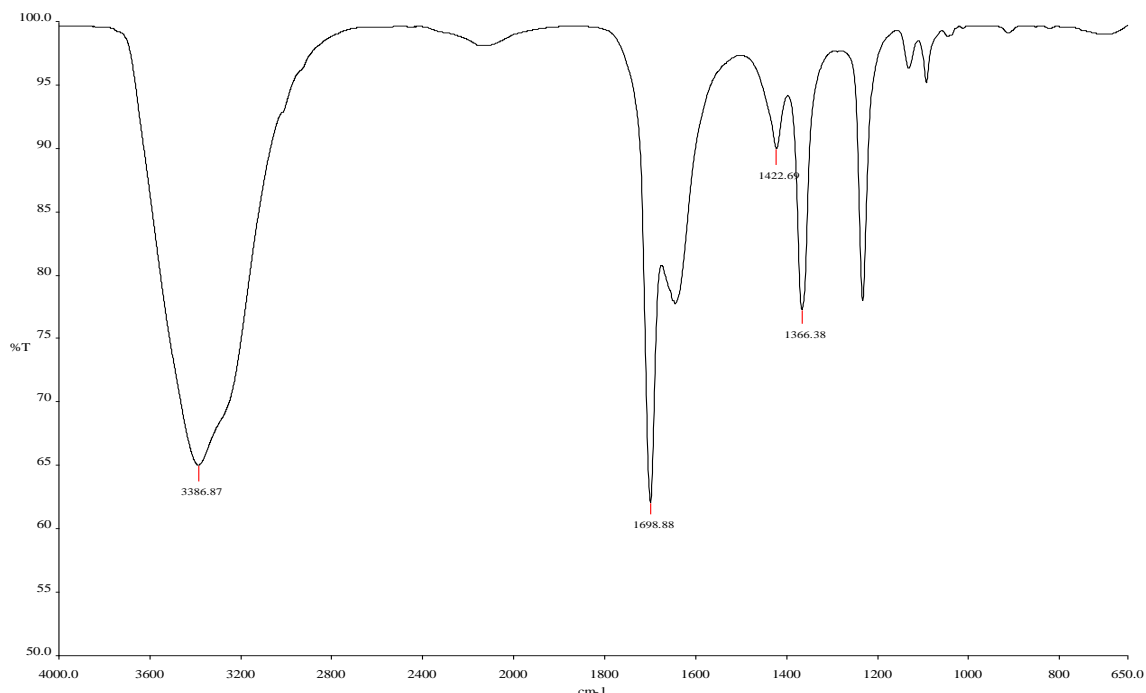
Evidencia de unión con el quitosano se tiene bandas que aparece en 1622.3 de una amida primaria, 1522.2  $\text{cm}^{-1}$  de los grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ), 1312.1  $\text{cm}^{-1}$  de una amina terciaria y en 1083.9 y 1032.02 aparecen las vibraciones del esqueleto de la estructura de quitosano, las cuales son indicativo de que la estructura del esqueleto no se altera durante la reacción de síntesis del copolímero.



**Figura A3.5** Espectro de infrarrojo medio de quitosano-poli ácido láctico (C1) (QPAL).

En la Figura A3.6 se muestra el espectro promedio de los sobrenadantes obtenidos después de evaporarle la acetona.



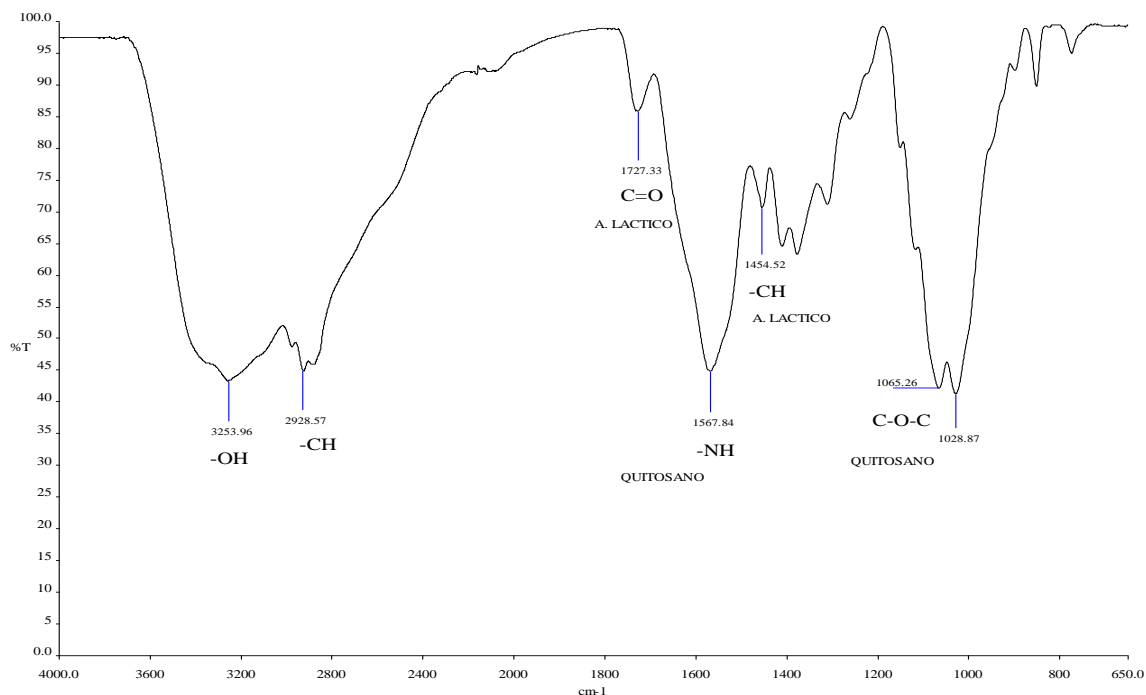


**Figura A3.6** Espectro promedio de los sobrenadantes de QPAL recuperado por filtración.

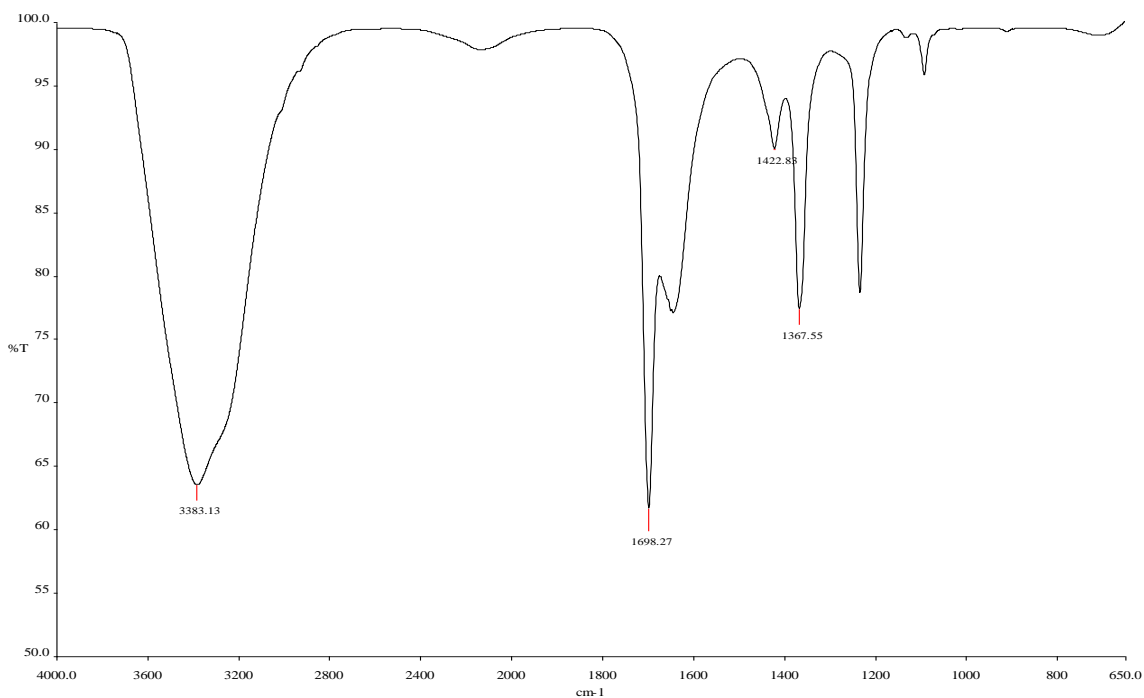
En el copolímero hay un gran cantidad de ácido láctico, debido al aumento en el aumento de taño de las bandas características de este, conuerda a lo reportado por Mazo *et al*, (2011) que en la formación de PLA las bandas a 1451 y 1373  $\text{cm}^{-1}$  flexiones simétricas de los grupos CH y CH<sub>3</sub> aumentan, la señal a 1090  $\text{cm}^{-1}$  estiramiento -C-O- aumenta por la formación de los enlaces éster.

En la Figura A3.7 se observa el espectro de FTIR de QPLA del quitosano C1 que presenta gran similitud con el espectro correspondiente al quitosano, como principales bandas confirmativas de este aparece en 1567.8  $\text{cm}^{-1}$  los grupos -NH<sub>2</sub>, en 1065.2 y 1028.8 aparecen las vibraciones del esqueleto de la estructura de quitosano, las cuales son indicativo de que la estructura del esqueleto no se altera durante la reacción de síntesis del copolímero. Además aparecen dos bandas nuevas característica en 1727.3 y 1454.5  $\text{cm}^{-1}$  que nos indica estiramiento del grupo carbonilo y flexiones simétricas de CH, y el ensanchamiento de la banda del grupo amino (1567.8  $\text{cm}^{-1}$ ) por el traslape de la banda de la amina primaria proveniente de la incorporación de la molécula de ácido láctico, con lo cual se afirma la síntesis del copolímero.

En la Figura A3.8 se muestra el espectro promedio de los sobrenadantes de QPLA después de evaporarle la acetona. Y al igual que en los polímeros anteriores se determina por las bandas en el espectro que su principal componente es ácido láctico.

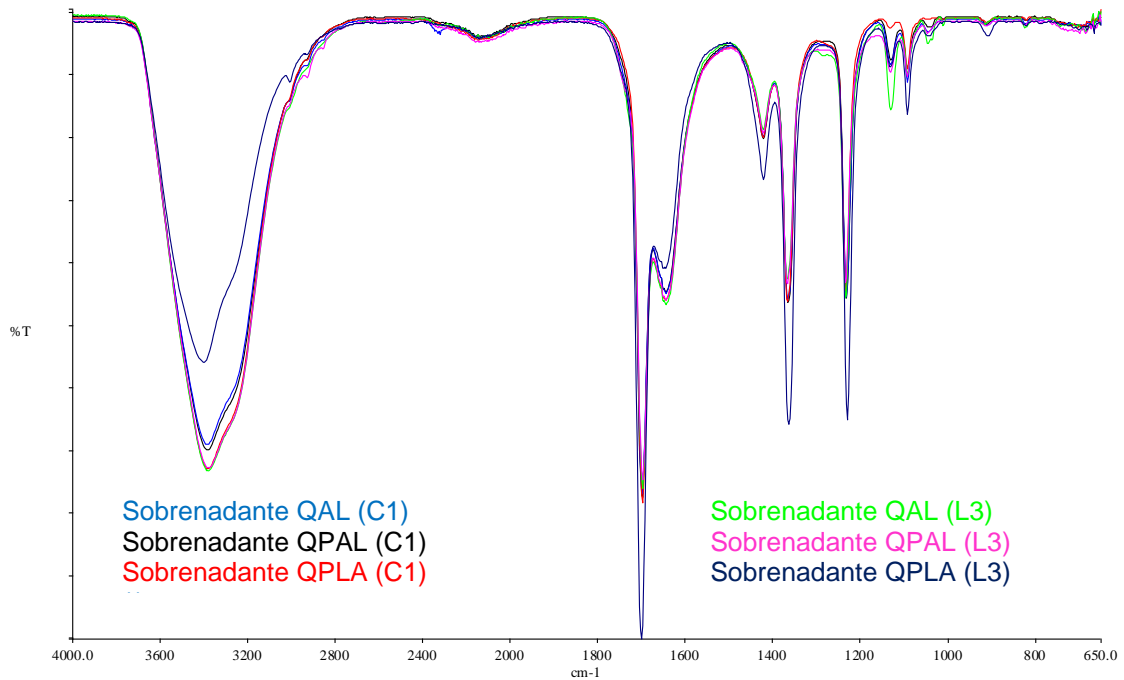


**Figura A3.7.** Espectros de infrarrojo medio de quitosano-poli (láctido) (C1) (QPLA).



**Figura A3.8** Espectro promedio de los sobrenadantes de QPLA después de evaporarle la acetona.

En la figura A3.9 se muestra la comparación de los espectros promedio de los sobrenadantes obtenidos después de evaporarle la acetona de los tres copolímeros del quitosano C1.

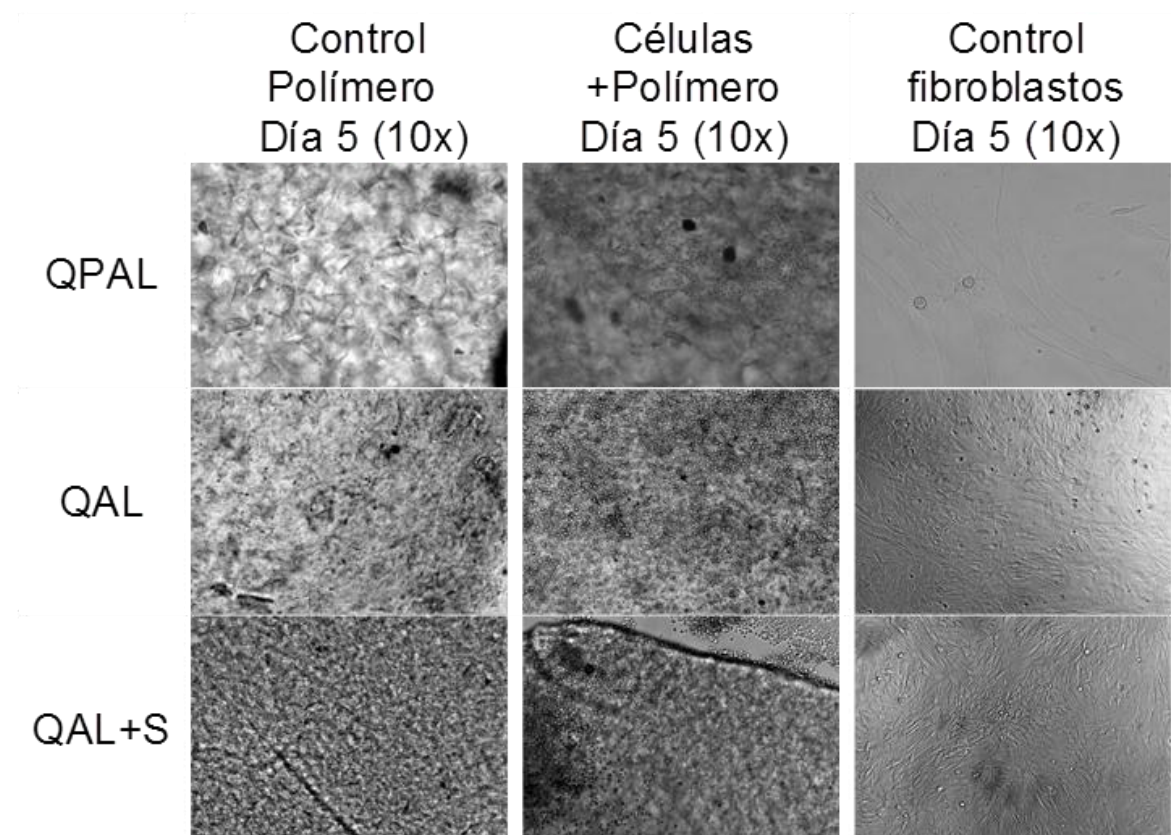


**Figura A3.9** Comparación entre los espectros promedio de los sobrenadantes de QAL, QPAL y QPLA después de evaporarle la acetona.

**A4.** Micrografías de luz visible, fluorescencia y SEM de los primeros ensayos biológicos. Cabe mencionar que las micrografías mostradas en esta sección son las de los primeros cultivos celulares con los polímeros del quitosano C1.

#### **A4.1 Primer cultivos celular.**

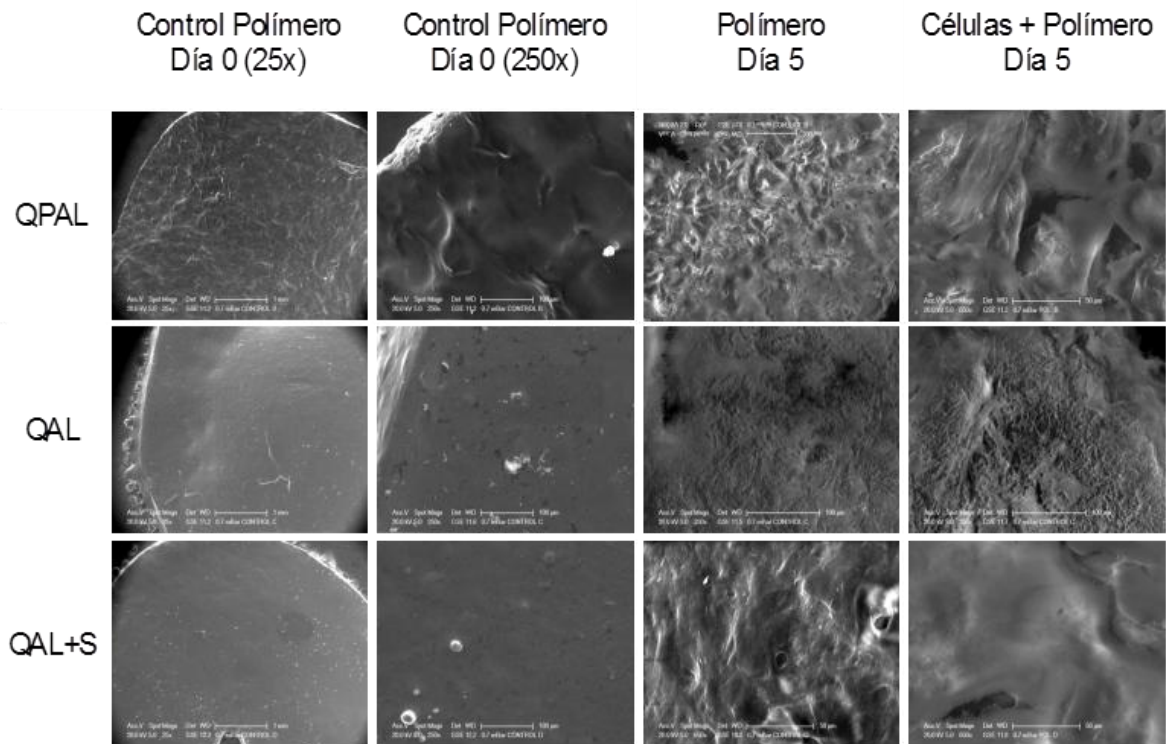
En este primer ensayo se trato de dilucidar las condiciones de lavado y el tamaño del polímero y la cantidad de medio que llevaría el inculo, después de inoculados se dejaron incubar por 5 días y se analizaron. Los resultados de esta prueba se observan en la Figura A4.1.



**Figura A4.1.** Micrografías de los QAL, QAL+S y QPAL del primer ensayo.

En las cuales en el control como era de esperarse no hay células, mientras que en los experimentales se observan gran cantidad de células pero sin adherirse a los polímeros, estos resultados pudieron deberse a que el medio se acidifico. Se realizó MEB para determinar si había células adheridas aunque no tuvieran la morfología esperada para cultivo celular.

Las muestras de cada copolímero fueron cortadas a la mitad y fijadas, también se agregó un control de cero días para la comparación, el cual solo fue humedecido y directamente observado. Los resultados se observan en la Figura A4.2.



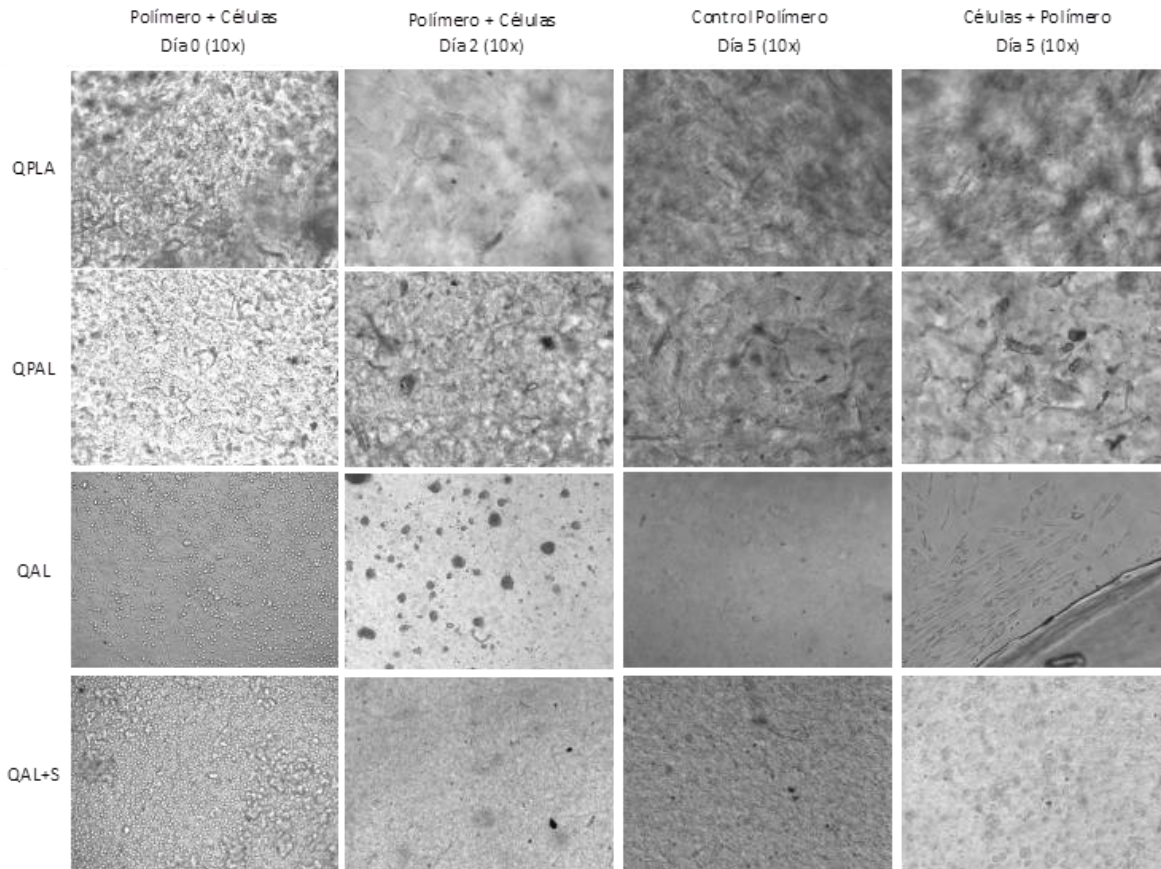
**Figura A4.2.** Micrografías de SEM los copolímeros control y con células del primer ensayo.

La Figura A4.2 se observa que la superficie del polímero QPAL es rugosa, con muy variados relieves, esto se confirma al aumentar la resolución a 250x, el polímero a los 5 días de cultivo se observa muy erosionado puesto que se disgrega en forma de hojuelas, por lo en la unidad experimental no se encontraron células; mientras que el polímero QAL Y QAL+S muestran una superficie lisa a una resolución de 25x pero al aumentar hasta 250x se observan pequeñas fisuras lo que indica que no es homogénea la superficie. Al observar estos mismos materiales a los 5 días de cultivo tanto el control como la unidad experimental presentan erosión pero no tan marcada como en QPAL; sin embargo, no hubo presencia de células en las unidades experimentales.

#### **A4.2 Segundo cultivo celular.**

Debido a que en el ensayo anterior no hubo presencia de células por la acides del medio, se aumentó el número de lavados tanto de PBS como del medio plano y se agregó entre estos dos tres lavados con un medio basificado para tratar de tener los materiales en las condiciones idóneas a un pH 7.4, en el ensayo se incluyó a QPLA porque en el ensayo anterior no se pudo cortar.

Los resultados se observan en la Figura A4.3, en el tiempo 0 en las unidades experimentales se observa que hay una gran cantidad de células sobre estos, aunque en los materiales QPAL Y QPLA es difícil apreciación de las células debido a lo rugoso del material.



**Figura A4.3.** Micrográficas de luz visible de QAL, QAL+S, QPAL y QPLA del segundo ensayo.

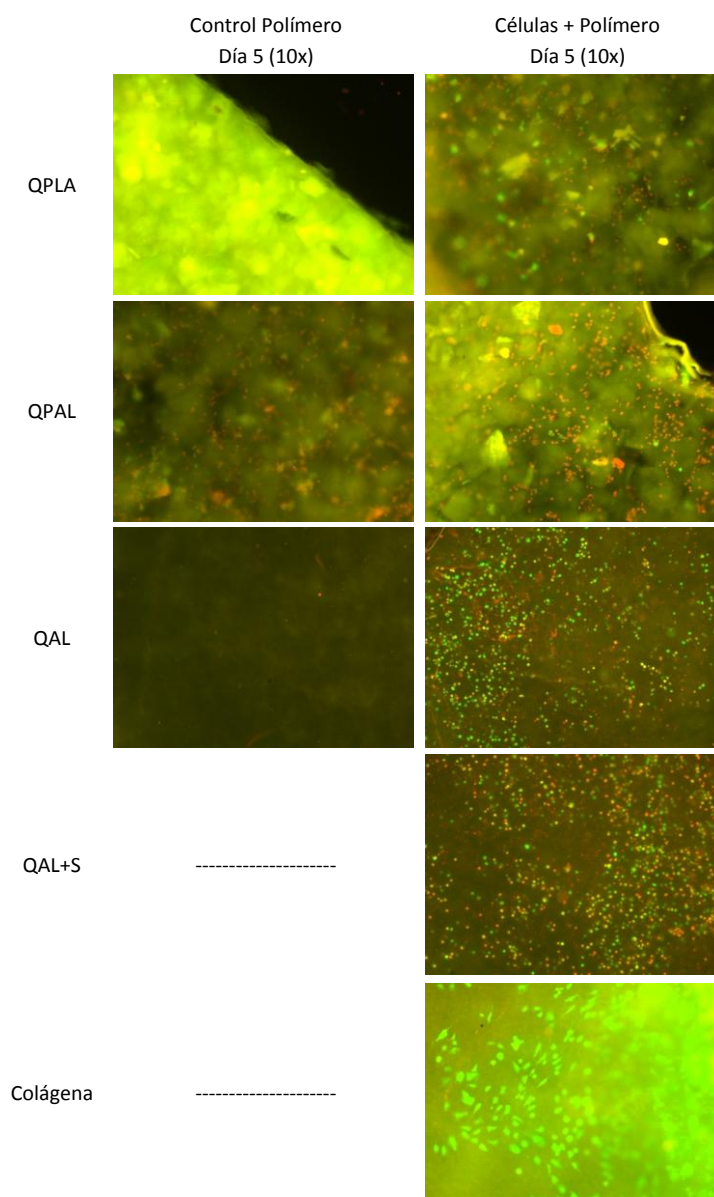
Las unidades experimentales observadas al día 3 de cultivo, mostraron la presencia de células pero estaban aglomeradas como se observa con más detalle en la micrografía del copolímero QAL.

A los 5 días de cultivo la cantidad de células disminuyó pero no se observaron adheridas a los polímeros y siguieron estando en su forma de esfera, cabe mencionar que en los dos primeros polímeros de la Figura A4.3 se complicó el observar las células debido a su forma rugosa por lo que es difícil enfocar dichas células.

Como en las micrográficas anteriores se encontraron células se les realizó la prueba de viabilidad celular para determinar si estaban vivas o muertas, los resultados se muestran en la Figura A4.4.

Los polímeros presentaron células vivas (verde fluorescente) y muertas (rojo), sin embargo las células vivas no estaban adheridas a los polímeros, por lo que no estaban expresando su fenotipo, es decir no tenían una morfología alargada como se observó en la macrografía de colágena.

Esta unidad experimental con colágena se corrió solo para comparar como deberían estar las células vivas, adheridas y expresando su fenotipo.



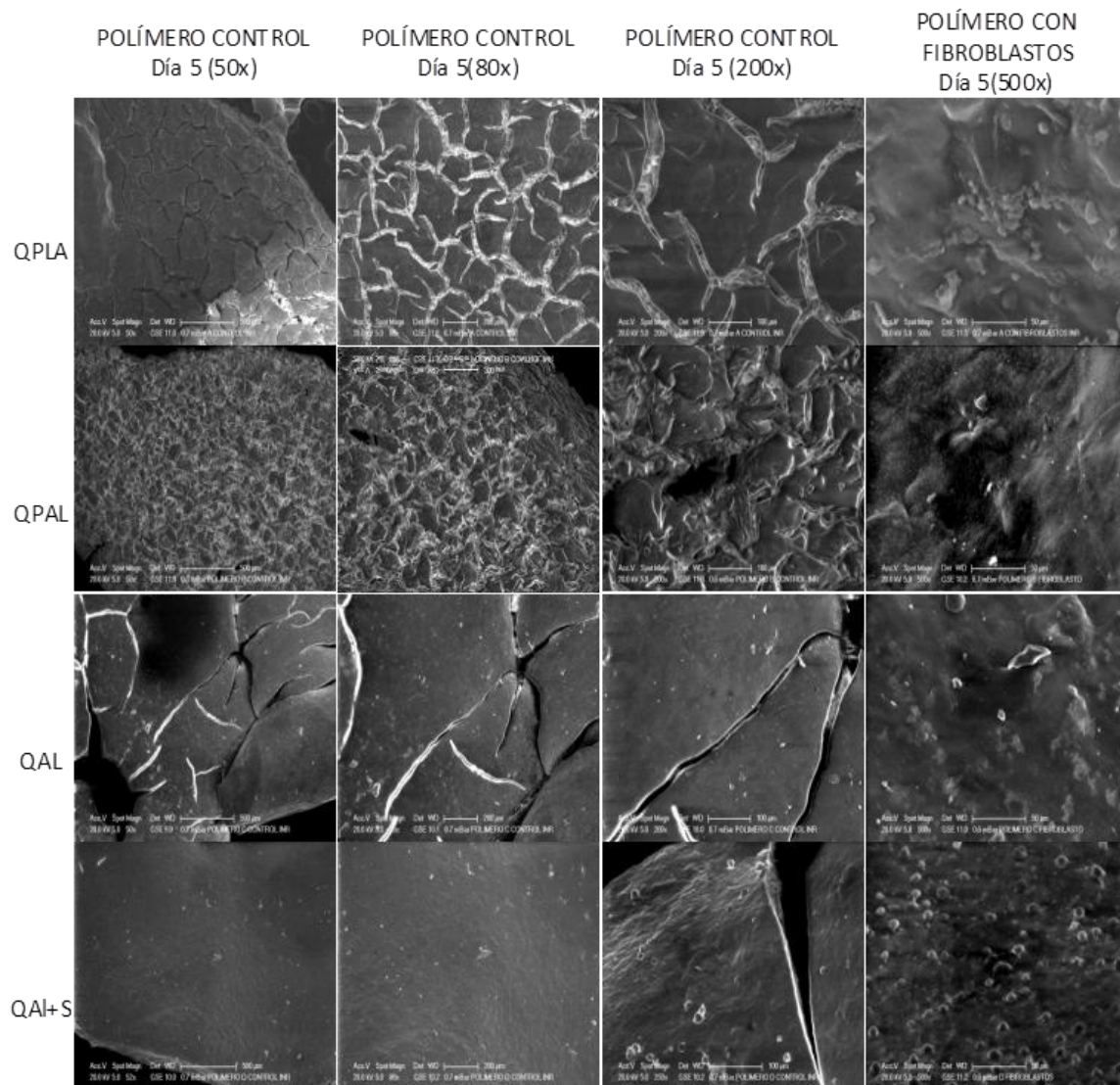
**Figura A4.4.** Micrografías con fluorescencia de los copolímeros y de colágena del segundo cultivo celular.

A la par de la prueba de calceína se realizó la prueba de microscopía electrónica de barrido cuyos resultados se muestran en la Figura A4.5.

En la Figura A4.5 se observa que tanto los controles como los experimentales presentan su estructura erosionada principalmente QPLA Y QPAL como se mencionó anteriormente se disgregan en forma de hojuelas. Las unidades experimentales no presentaron células, pero en el compuesto QAL se observan rastros de lo que parece ser matriz extracelular.

En este ensayo la ausencia de células podría deberse que al lavar los polímeros con el medio básico ahora se basificó el medio realizando el mismo efecto que el ácido, que es

la muerte de las células. Debido a que en este ensayo no se obtuvo resultado favorable con las células se realizó un tercer ensayo.



**Figura A4.5.** MEB de los copolímeros del segundo ensayo.

### A4.3 Tercer cultivo celular.

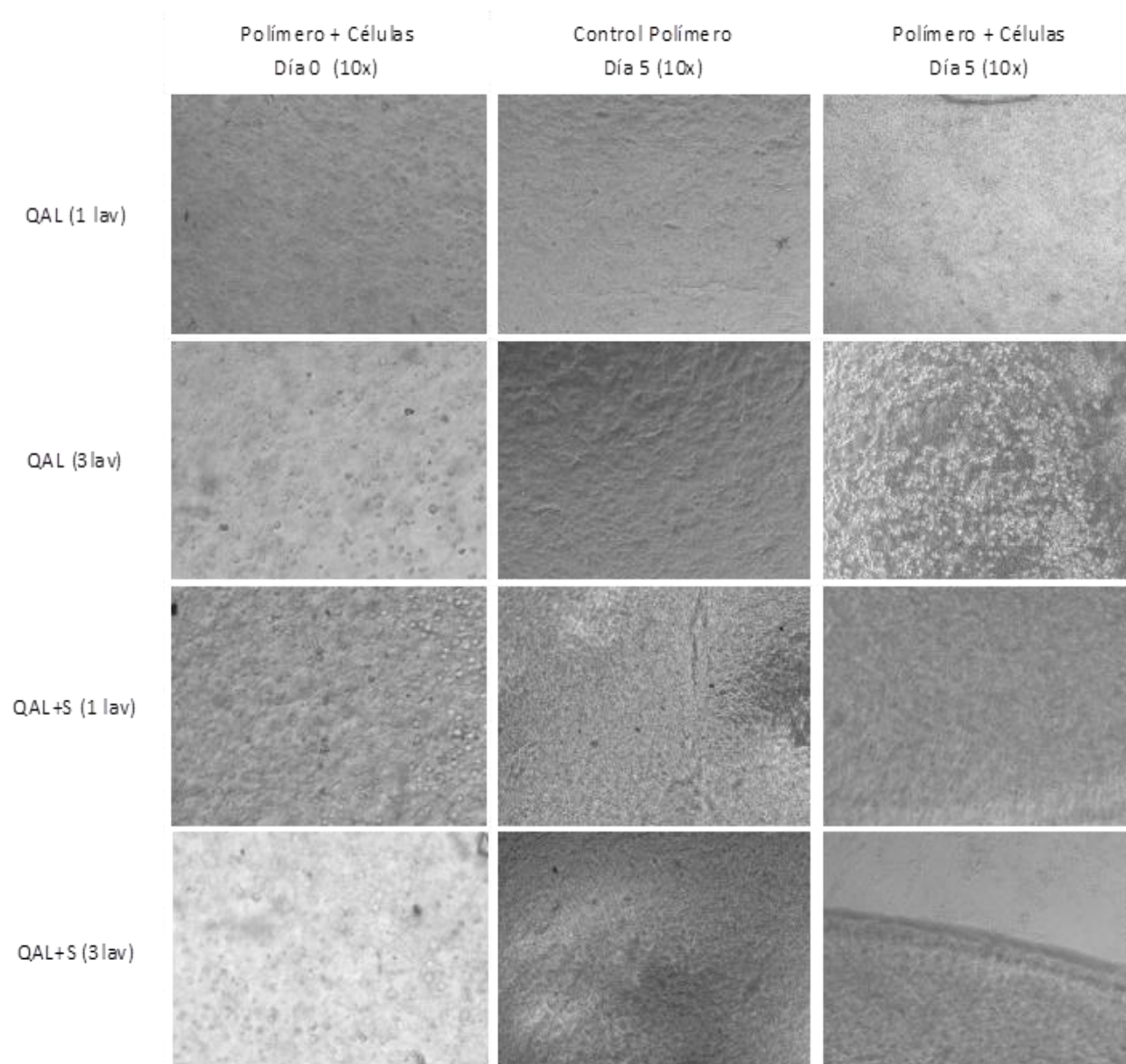
En este ensayo se comparo el efecto de lavar los polímeros solo una vez con medio básico contra lavar los polímeros tres veces con medio básico, puesto que los resultados anteriores de no haber células se atribuyeron a que ahora el medio se mantuvo básico, los resultados se observan en la Figura A4.6.

Como se muestra en la Figura A4.6 se determino que había más células en el tratamiento con tres lavados que un lavado con medio básico, sin embargo había que determinar si

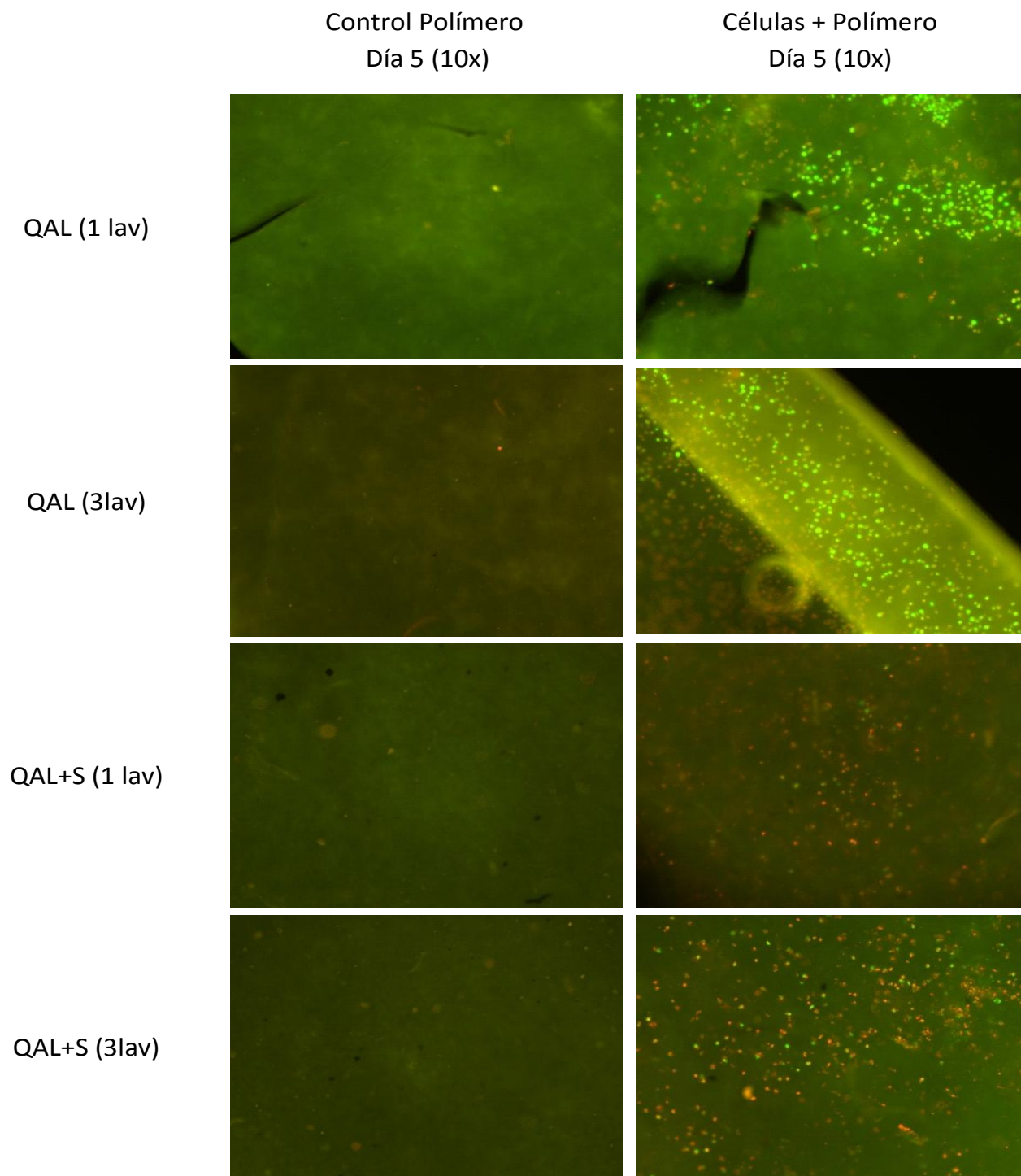


estas células están vivas o muertas, por lo que se realizó la prueba de viabilidad celular (Figura A4.7).

Se observa que en todos los polímeros hay tanto células vivas como muertas, pero si hay una mayor cantidad de células vivas en los que se hicieron con tres lavados, sin embargo, los polímeros con estas condiciones de lavados se degradaban más rápido por lo que se decidió solo dar un lavado con medio básico (Figura A4.7).



**Figura A4.6.** Micrografías de los polímeros del tercer ensayo.



**Figura A4.7** Micrografías de la prueba de calceína de los polímeros del tercer cultivo.

El que en algunos cultivos celulares no se realizara la prueba de SEM fue debido a la disponibilidad del equipo por reparaciones. Con este ensayo se concluye esta sección de anexos puesto que los demás resultados ya fueron mostrados en la sección 7 de la tesis.

**A5.** Análisis estadístico del efecto del tiempo de reacción y grado de acetilación en el porcentaje de incorporación.

**A5.1** Se realiza un análisis de varianza del efecto del tiempo de reacción en el porcentaje de incorporación de ácido láctico en el quitosano, medido gravimétrico y después en áreas,.

Hipótesis:

H<sub>0</sub>:  $\mu_{T1} = \mu_{T2} = \mu_{T3} = \mu_{T4}$  (las medias del tiempo de reacción tiene el mismo porcentaje de incorporación)

H<sub>a</sub>: al menos una de las medias es distinta.

Medido gravimétricamente.

### Descriptivos

Efecto del tiempo de reacción en el porcentaje de incorporación medido en peso

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1 hora	3	18.5000	5.21106	3.00860	5.5550	31.4450
2 horas	3	20.2200	9.69703	5.59858	-3.8687	44.3087
3horas	3	20.0067	8.03353	4.63816	.0503	39.9631
4 horas	3	17.8100	5.44537	3.14389	4.2829	31.3371
Total	12	19.1342	6.34638	1.83204	15.1019	23.1665

### ANOVA

Efecto del tiempo de reacción en el porcentaje de incorporación medido en peso

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	12.288	3	4.096	.076	.971
Intra-grupos	430.754	8	53.844		
Total	443.042	11			

**Incorporación de ácido láctico en quitosano medido en peso (%)**

Tukey B

Tiempo de reacción	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
4 horas	3	17.8100
1 hora	3	18.5000
3 horas	3	20.0067
2 horas	3	20.2200

## En áreas

### Descriptivos

Efecto del tiempo de reacción en el porcentaje de incorporación medido en áreas de IR.

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1 hora	3	6.4000	.01000	.00577	6.3752	6.4248
2 horas	3	7.0500	.01000	.00577	7.0252	7.0748
3 horas	3	5.1200	.01000	.00577	5.0952	5.1448
4 horas	3	5.8200	.01000	.00577	5.7952	5.8448
Total	12	6.0975	.74435	.21488	5.6246	6.5704

### ANOVA

Efecto del tiempo de reacción en el porcentaje de incorporación medido en áreas de IR.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	6.094	3	2.031	20312.750	.000
Intra-grupos	.001	8	.000		
Total	6.095	11			

### Incorporación de ácido láctico en quitosano medido en relación de áreas de IR

#### Tukey B

Tiempo de reacción	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
3 horas	3	5.1200			
4 horas	3		5.8200		
1 hora	3			6.4000	
2 horas	3				7.0500

**A5.2** Se realiza un análisis de varianza del efecto del grado de acetilación en el porcentaje de incorporación de ácido láctico en el quitosano, medido en peso y después en áreas.

Hipótesis:

H<sub>0</sub>:  $\mu_{T1} = \mu_{T2} = \mu_{T3} = \mu_{T4}$  (las medias del tiempo de reacción tiene el mismo porcentaje de incorporación)

H<sub>a</sub>: al menos una de las medias es distinta.

Como en el caso anterior medido gravimétricamente.

### Descriptivos

Efecto del grado de acetilación en el porcentaje de incorporación medido en peso.

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media	
					al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
DA<1	3	20.2200	9.69703	5.59858	-3.8687	44.3087
DA 1-10	3	20.0067	8.03353	4.63816	.0503	39.9631
DA 10-20	3	18.5000	5.21106	3.00860	5.5550	31.4450
DA>20	3	17.8100	5.44537	3.14389	4.2829	31.3371
Total	12	19.1342	6.34638	1.83204	15.1019	23.1665

### ANOVA de un factor

Efecto del grado de acetilación en el porcentaje de incorporación medido en peso.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	12.288	3	4.096	.076	.971
Intra-grupos	430.754	8	53.844		
Total	443.042	11			

### Incorporación de ácido láctico en quitosano medido en peso

Tukey B

Grado de acetilación	N	Subconjunto para alfa =
		0.05
		1
DA>20	3	17.8100
DA 10-20	3	18.5000
DA 1-10	3	20.0067
DA<1	3	20.2200

Medido en relación de áreas de IR.

### Descriptivos

Efecto del grado de acetilación en el porcentaje de incorporación medido en relación de áreas de IR

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media	
					al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
DA<1	3	7.488000	.0005000	.0002887	7.486758	7.489242
DA 1-10	3	9.289000	.0005000	.0002887	9.287758	9.290242
DA 10-20	3	8.502000	.0005000	.0002887	8.500758	8.503242
DA>20	3	4.442000	.0005000	.0002887	4.440758	4.443242
Total	12	7.430250	1.9214038	.5546615	6.209448	8.651052

### ANOVA de un factor

Efecto del grado de acetilación en el porcentaje de incorporación medido en relación de áreas de IR

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	40.610	3	13.537	54146291.000	.000
Intra-grupos	.000	8	.000		
Total	40.610	11			

### Incorporación medido en relación de áreas de IR

Tukey B

Grado de acetilación	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
DA>20	3	4.442000			
DA<1	3		7.488000		
DA 10-20	3			8.502000	
DA 1-10	3				9.289000