

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS

**“DESARROLLO DE MICROPARTICULAS DE
QUITOSANO ENTRECruzADO Y
CUATERNIZADO PARA LA ADSORCIÓN DE
ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)”**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

LICENCIADO EN QUÍMICA

ELABORADO POR

José Luis Cconislla Bello

ASESOR

Mg. Christian Ronald Jacinto Hernandez

LIMA – PERÚ

2017

*A mis amados padres por ser la
esencia de mi vida, a mis hermosas hermanas queridas por todo el
apoyo que me brindaron, a mis sobrinos por todo su amor incondicional
y a mi preciosa pareja de la
vida quien lleva en su ser al fruto de nuestro amor invencible.*

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer sinceramente al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad (Innovate Perú) contrato 118-PNICP-PIAP-2015 por el financiamiento para la realización de esta tesis, a mis asesores, Mg. Christian Jacinto Hernández y Dr. Ana Valderrama Negrón, por el apoyo y los consejos brindados durante la realización del presente trabajo y durante mis años de estudios.

A los miembros del Grupo de Investigación de análisis instrumental y medio ambiente, por el constante apoyo que me brindaron durante las diferentes etapas de la realización de esta tesis; al Dr. Holger Mayta Malpartida, a Martha Helena Jahuiria Arias, a Alejandra Pando Caciano por el apoyo y facilidades brindadas, durante mi permanencia en el laboratorio de investigación y desarrollo LID (laboratorio 114) de la Universidad Cayetano Heredia para la realización de las pruebas de adsorción de ADN; al Dr. Juan Manuel Iglesias Pedraza, al Dr. Javier Enciso Gutiérrez, a Carlos Cisneros, a la Sra. Fabiola por el apoyo en la permanencia en el laboratorio de Cultivo Celular de la Universidad Científica del Sur; a la Dr. Pilar Taboada Sotomayor por el gran apoyo en el análisis de mis muestras; finalmente, a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo.

RESUMEN

Se prepararon micropartículas de quitosano de diferentes tipos como: quitosano entrecruzado (QE: QE1%, QE5% y QE10%) con glutaraldehído (GL), quitosano cuaternizado (QC: QC1, QC2 y QC3) con cloruro de glicidil trimetil amonio (CTAG) y quitosano cuaternizado entrecruzado (QCE), partiendo de QC entrecruzándolo con GL. Las micropartículas preparadas se caracterizaron y fueron sometidas a pruebas de adsorción de ADN. Para la caracterización de las micropartículas de quitosano se utilizaron distintas técnicas como espectroscopia FTIR, difracción de rayos X (DRX), análisis termogravimétrico (TGA), análisis térmico diferencial (DTG) y microscopia de electrónica de barrido superficial (SEM). La cantidad de ADN adsorbida en las micropartículas se determinó por espectroscopia UV en un equipo NanoDro2000 obteniéndose resultados muy alentadores. Los modelos de adsorción de Langmuir y Freundlich se aplicaron para describir las isothermas de equilibrio. El modelo de Freundlich fue el que se adaptó mejor con los datos experimentales.

**Desarrollo de tipos de micropartículas
de quitosano entrecruzado y
cuaternizado para la adsorción de
ácido desoxirribonucleico ADN
(INDICE)**

	Pág
1. ASPECTOS GENERALES	
A. PRESENTACIÓN	2
B. OBJETIVOS DE LA TESIS	5
2. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO	
2.1. QUITOSANO	8
2.1.1 Obtención	10
2.1.2 Química del quitosano	13
2.1.2.1 Formación de policomplejos	13
2.1.2.2 Reacciones de entrecruzamiento	16
2.1.2.3 Cuaternización (alquilación exhaustiva del grupo amino)	19
2.1.3 Aplicaciones	23
2.1.3.1 Química analítica	23
2.1.3.2 Biomedicina	24
2.1.3.3 Agricultura y ganadería	24
2.1.3.4 Cosméticos	24
2.1.3.5 Dietéticos	24
2.1.3.6 Industrias	24
2.1.3.7 Tratamientos de aguas	25
2.1.4 Quitosano como adsorbente	27
2.1.4.1 Isoterma de adsorción	29
Isoterma de Langmuir	30
Isoterma de Freundlich	34
2.1.5 Técnicas de caracterización	35

2.1.5.1	Microscopia electrónica de barrido (SEM)	35
2.1.5.2	Análisis Termogravimétrico (TGA)	37
2.1.5.3	Difracción de rayos x en polímeros (DRX)	40

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1	MATERIALES	49
a.	Reactivos	49
b.	Equipos	50
3.2	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	51
3.2.1	CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO DE PARTIDA	51
3.2.1.1	Determinación del grado de desacetilación por valoración potenciométrica	51
3.2.1.2	Determinación del grado de desacetilación método FTIR	52
3.2.1.3	Determinación de la masa molecular promedio viscosimétrica (Mv) del quitosano	53
3.2.1.4	Espectroscopia FTIR de quitosano	54
3.2.2	ENTRECRUZAMIENTO DE QUITOSANO (QE)	55
3.2.2.1	Preparación de quitosano entrecruzado con glutaraldehído	55
3.2.2.2	Caracterización de quitosano entrecruzado	56
i)	Espectroscopia infrarroja. FTIR de QE	56
3.2.3	CUATERNIZACIÓN DE QUITOSANO (QC)	56
3.2.3.1	Preparación de micropartículas de quitosano cuaternizado	56
3.2.3.2	Caracterización de quitosano cuaternizado	57
i)	Determinación del grado de cuaternizado	57

ii)	Espectroscopia infrarroja. FTIR de QC	58
3.2.4	ENTRECRUZAMIENTO DE QUITOSANO CUATERNIZADO CON GLUARALDEHÍDO (QCE)	58
3.2.4.1	Preparación de quitosano cuaternizado entrecruzado con glutaraldehído	58
3.2.4.2	Caracterización de quitosano cuaternizado entrecruzado con glutaraldehido	59
i)	Espectroscopia infrarroja. FTIR de QCE	59
3.2.5	PROCESO DE ADSORCIÓN DE ADN	59
3.2.5.1	Preparación de las curvas de adsorción de ADN.	59
4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES		
	RESULTADOS	62
	CONCLUSIONES	108
5. BIBLIOGRAFÍA		109
6. ANEXOS		122

Capítulo 1

ASPECTOS GENERALES

A. PRESENTACIÓN

Los polímeros naturales, tales como celulosa, agarosa dextrano, alginato y quitosano se han utilizado con frecuencia como material absorbente [1-2]. El quitosano un polímero orgánico que existe ampliamente en la naturaleza, es un polisacárido hidrófilo y biocompatible. Sus grupos amino e hidroxilo proporcionan sitios activos de reacción, para el fácil acoplamiento de diversos grupos funcionales para introducir propiedades deseadas [3]. Esta variabilidad de interactuar con distintos grupos químicos hace que el quitosano sea considerado un adsorbente ideal [4]. Esto ya está comprobado a gran escala, se sabe que numerosos iones metálicos podrían estar unidos fácilmente a estos grupos debido a los efectos quelantes [5], y varios tintes podrían ser también atraídos a través de algunas interacciones específicas tales como atracción electrostática, covalente o intermolecular [6-7].

Por otra parte, sobre la base de la relación estructura-actividad de los materiales, diversos grupos funcionales podrían ser flexible injertados en quitosano no solo para la adsorción eficaz de contaminantes o colorantes, también viendo otros ámbitos de la ciencia, como seda en la biomedicina, que en las últimas décadas se está dando un interés creciente hacia el uso de sistemas de entrega para un tratamiento más eficaz de diversas enfermedades y la investigación cada vez más va centrado en el diseño de soluciones innovadoras basadas en vectores intra-celulares, en este caso el quitosano cumple un papel muy importante debido a sus propiedades biológicas (biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesividad, y la capacidad de permeabilidad potenciador) están siendo objeto de estudios por su uso potencial en la terapia genética centrado en la formación de policomplejos QUITOSANO-ADN [8],

y así, como también en la inmovilización de ADN [9]. Estas propiedades estudiadas del quitosano señalan claramente que tiene un mayor potencial de desarrollo y aplicabilidad a futuro en diferentes campos de la ciencia, pues se está empleando en administración de fármacos, administración de genes, células de imágenes, sensores y también en el tratamiento contra el cáncer. Por otro lado también se vienen estudiando los nanomateriales a base de quitosano los cuales tienen propiedades físicas y químicas mejoradas tales como alta área superficial, porosidad, resistencia a la tracción, conductividad, fotoluminiscente, así como el aumento de las propiedades mecánicas en la comparación con el quitosano puro.

Es por esta razón que el objetivo de este estudio se va a centrar en la preparación y caracterización de diferentes tipos de micropartículas de quitosano modificado químicamente, para darles un posible uso en la captación de ADN en agua. Siendo esto el inicio de estudios futuros donde se podrá llevar las prueba a muestras reales como la orina humana.

Es en este sentido quitosano entrecruzado (QE), quitosano cuaternizado (QC) y quitosano cuaternizado entrecruzado (QCE) se prepararan atreves de métodos simples y se caracterizaron por espectroscopia FT-IR, DRX TGA y SEM, para luego emplearse en la adsorción de ADN.

La cuaternización y el entrecruzamiento de quitosano se lograron por la adición de cloruro de glicidiltrimetilamonio (CTAG) y glutaraldehído (GL) respectivamente.

- i. Trabajo experimental en laboratorio químico, realizado en el ambiente de Investigación de análisis instrumental y Medio Ambiente, ubicado en el Laboratorio

R2-408 de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería y, que comprendió la caracterización del quitosano de partida: determinación de la masa molecular, grado de desacetilación, FTIR, DRX y TGA; también la preparación de los distintos tipos de quitosano como su respectiva caracterización: determinación de grado de cuaternización (método potenciométrico) FTIR, DRX, y TGA. Esta etapa se realizó entre agosto del año 2015 y mayo del año 2016.

- ii. Las pruebas de adsorción de ADN para la construcción de las curvas de isoterma de adsorción. Esta etapa del trabajo se realizó en el ambiente de investigación Biológica-Viral, ubicado en el LID Laboratorio 114 de la Universidad Cayetano Heredia, bajo la dirección del Dr. Holger Mayta y la asesoría de Martha Helena Jahuiria Arias y Alejandra Pando Caciono de Junio-Agosto del 2016.
- iii. Los análisis DRX, TGA, DTG y SEM se realizaron en Brasil, Universidad de Sao Paulo /FFCLRP/Depto. de Química.

B. OBJETIVOS DE LA TESIS

Los objetivos de la presente tesis son los siguientes:

Objetivos generales:

- Preparación y caracterización de los distintos tipos de micropartículas de quitosano, modificado químicamente con Cloruro de glicidil trimetil amonio (CTAG) y entrecruzado con glutaraldehído (GL), para su aplicación en la adsorción de ADN.

Objetivos específicos:

- i. Determinar el grado de desacetilación, la masa molecular del quitosano de partida y Caracterizar el quitosano por: espectroscopia infrarroja (FTIR), difracción de rayos x (DRX) análisis termogravimétrico (TGA y DTG) y análisis por microscopia de barrido electrónico (SEM).
- ii. Preparación de las micropartículas de QE entrecruzados con Glutaraldehído (GL), QC cuaternizados con Cloruro de glicidil trimetil amonio (CTAG) y QCE.
- iii. Caracterizar las micropartículas de quitosanos modificados químicamente (QE, QC y QCE) por técnicas analíticas (titulación conductimétrica) y técnicas instrumentales FTIR, DRX, TGA, DTG y SEM).
- iv. Realizar pruebas de adsorción de ADN con las micropartículas de quitosano modificado químicamente (QE, QC y QCE).

Nuestro principal objetivo en esta tesis, es la preparación de los diferentes tipos de micropartículas de quitosano (QE, QC y QCE) y su caracterización, esto nos llevó al uso de diversas técnicas analíticas y de instrumentación respectivamente, la parte aplicativa de la adsorción nos mostrara el posible uso de las micropartículas de quitosano en la adsorción de ADN en agua.

Capítulo 2

ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

2.1 QUITOSANO.

Por su amplia distribución en la naturaleza la quitina es el segundo polisacárido en abundancia, después de la celulosa. Fue descubierta por Braconnot en 1811 cuando estudiaba las sustancias derivadas del Agáriscos Volváceas y otros hongos. Posteriormente Odier, en un artículo sobre insectos reporto que había encontrado en algunos insectos la misma sustancia que forma la estructura de las plantas, llamándola “quitina” (del griego tunic, envoltura). Payen, en 1943, inició una controversia que duró más de cien años sobre las diferencias entre la quitina y la celulosa, en parte porque se pensaba que la presencia de nitrógeno reportada en algunas investigaciones se debía a residuos de proteínas que no podían ser completamente eliminados de las muestras.

El nombre sistemático de la quitina es $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa. Se encuentra principalmente en las conchas de crustáceos y formando parte del exoesqueleto de los insectos, así como también de las paredes celulares de muchos hongos, levaduras y algas [10]. La quitina es completamente soluble en agua o en medio ácido. Su estructura es la siguiente:

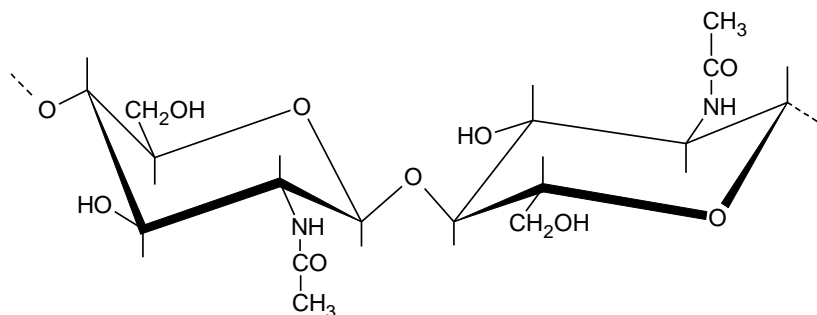


Figura N° 1: Unidad repetitiva de la quitina

Por su parte, el quitosano es también un polisacárido que se encuentra en estado natural en las paredes de algunos hongos; sin embargo, su principal fuente de producción es la hidrólisis de la quitina en medio alcalina, usualmente hidróxido de sodio o de potasio, a altas temperaturas. El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos. Esta “quitina modificada”, como él la llamó, se tornaba de color violeta en soluciones diluidas de yoduro y ácido, mientras la quitina era verde. Más tarde, en 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler quién la denominó “quitosano” (también se conoce como quitosana en algunos lugares, chitosan en inglés) [11].

El quitosano es considerado un polímero heterogéneo de unidades D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, es también un material altamente variable en sus características, entre ellos el porcentaje de desacetilación, masa molecular y cristalinidad. Estas características también pueden ser explicadas en el origen del material, ya que la quitina puede ser extraída de diferentes materiales biológicos, las cuales darán origen a tres tipos de quitina y estas son definidas en relación con la orientación de sus cadenas: un arreglo antiparalelo se denomina α -quitina, forma más estable y abundante (generalmente se encuentra en la cutícula de artrópodos y exoesqueletos de cangrejos y camarones), un arreglo paralelo se denomina β -quitina, y una mezcla de arreglos, dos paralelos y uno antiparalelo se denomina γ -quitina (ambas formas obtenidas a partir del esqueleto del calamar). Estas tres formas generalmente diferenciadas en la dureza, siguiendo el orden: α -quitina, β -quitina, γ -quitina. Otra razón que puede afectar las características del material son las

condiciones experimentales empleadas en la obtención de la quitina y quitosano. Esto básicamente puede afectar el porcentaje de desacetilación, la cristalinidad y la masa molecular del quitosano [12].



Figura N° 2: Gambas de *Pandalus borealis* (crustáceo) para la obtención del quitosano comercial.

2.1.1 Obtención.

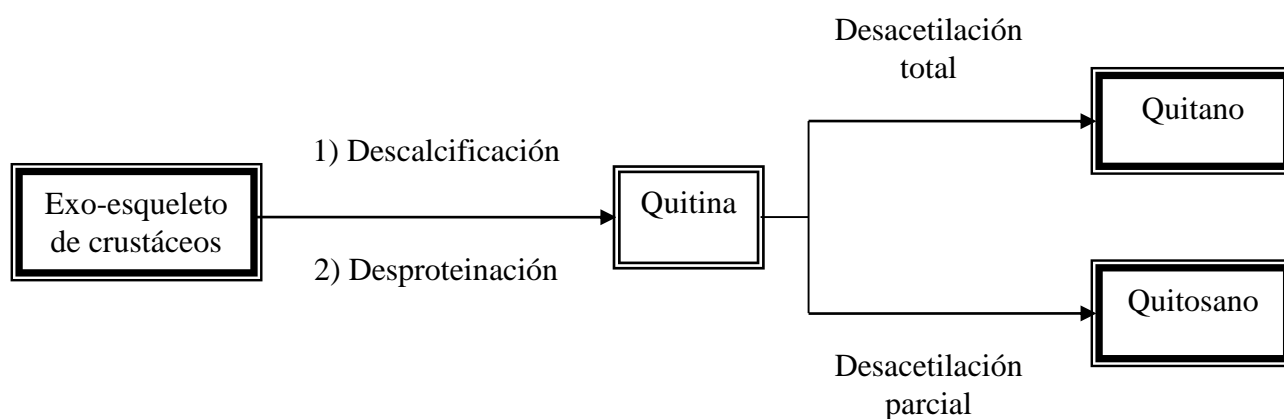


Figura N° 3: Esquema elemental de la producción de los derivados de la quitina.

El quitosano se produce comercialmente mediante la desacetilación de la quitina. La quitina es muy estable a los ácidos y álcalis y no es soluble en disolventes ordinarios. Por lo tanto, se puede aislar como un producto que permanece después de la descomposición con ácido y álcali de las otras sustancias presentes en el exoesqueleto. El exoesqueleto primero se limpia y trata con ácido para remover el carbonato de calcio. Para la desmineralización generalmente se utiliza HCl, HNO₃, H₂SO₃, CH₃COOH o HCOOH, pero el HCl es el preferido y se usa en concentraciones entre 0.3 y 2 M durante 1-48 h a temperaturas que varían de 0 a 100°C. El HCl durante el proceso también disminuye el peso molecular de la quitina. El exoesqueleto descalcificado, se corta en pequeños pedazos o se pulveriza y se desproteíniza con tratamientos alcalinos. La solución alcalina penetra en los intersticios de la matriz del caparazón para romper el enlace entre las proteínas y la quitina. Típicamente se trata con soluciones acuosas de NaOH 1-2 M durante 1-72 h a temperaturas que varían de 65 a 100°C. La quitina se obtiene como un polvo blanquecino. El tratamiento alcalino, además, produce desacetilación en la molécula de quitina. También se pueden utilizar métodos complementarios al tratamiento ácido-base. Por ejemplo, la degradación enzimática de las proteínas con proteáceas en condiciones suaves. Sin embargo, después del tratamiento permanece proteína residual entre 1 a 7% y el tiempo de reacción es más largo comparado con el método químico [13].

La desacetilación completa de la quitina produce un material totalmente soluble en medio ácido conocido como quitano; sin embargo, cuando la desacetilación del material de partida es incompleta se crea una mezcla de cadenas que tienen distintas proporciones de unidades $\beta(1-4)$ -2-acetamida-2-desoxi-D-glucosa y $\beta(1-4)$ -2-amino-

2-desoxi-D-glucosa, cuya relación depende de las condiciones de reacción y que obviamente, genera materiales con distintas propiedades denominados quitosanos. La diferencia en las propiedades de estos materiales puede llegar a ser notable, como por ejemplo la distinta solubilidad en medio acuosa que puede llegar a tener. Las estructuras químicas del quitano y el quitosano se muestran a continuación:

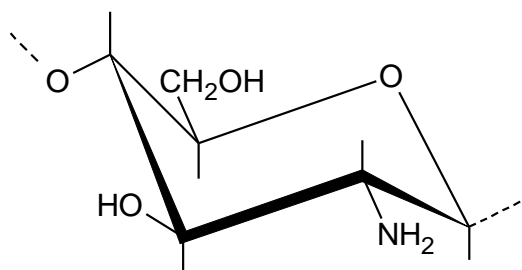


Figura N° 4: Unidad repetitiva del quitano.

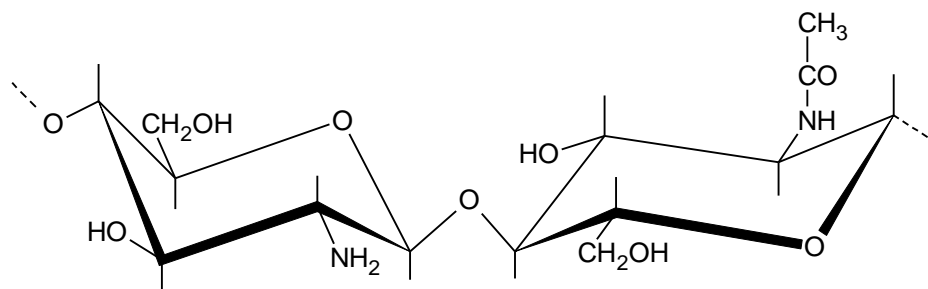


Figura N° 5: Unidad repetitiva del quitosano.

La presencia de grupos aminos en la cadena polimérica ha hecho del quitosano uno de los materiales más versátiles que se estudian desde hace ya algún tiempo, por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones, tales como las reacciones de anclaje de enzimas, reacciones de injerto, obtención de películas entrecruzadas, etc., de las cuales se obtienen materiales con propiedades adecuadas para aplicaciones inmediatas y futuras en biotecnología, biomedicina, agricultura, etc. Es importante recalcar la febril actividad que se desarrolla en torno a estos materiales, lo que se ha traducido en la aparición de Congresos, Simposios, Conferencias, etc., dedicados exclusivamente a ellos. Su importancia adquirió matiz internacional como materiales poliméricos de primer orden, especialmente por su biodegradabilidad [14].

2.1.2 Química del quitosano:

En esta parte se expondrán resumidamente algunos de los resultados más actuales en las reacciones del quitosano:

2.1.2.1 Formación de policomplejos:

Los complejos polielectrolitos son formados por la atracción electrostática de dos polielectrolitos con cargas opuestas como fuerza conductora del proceso. Por su naturaleza policationica, el quitosano ha sido usado para la complejación de proteínas acídicas en una variedad de fluidos biológicos, los cuales pueden ser manipulados con relativa facilidad [15]. Igualmente se ha logrado preparar una serie de policomplejos que tienen características de hidrogeles, motivo por el cual ha sido posible estudiarlos en la liberación controlada de drogas, incluyendo tratamientos anticancerosos [16].

En su proceso de hinchamiento normalmente los hidrogeles preparados por el entrecruzamiento de una sola especie de polielectrolito (un policación o un polianión) son altamente sensibles al pH del medio. Por lo general, los hidrogeles preparados con quitosano logran un grado de hinchamiento máximo a valores de pH ácidos bien determinados, debido a que el máximo grado de hinchamiento de estos materiales surge de un compromiso entre la máxima repulsión que pueden experimentar los grupos cargados y el mínimo apantallamiento que genera la adición de un exceso del ácido. En el caso de los complejos polielectrolitos, entrecruzados químicamente en reacciones posteriores, es posible obtener materiales que se hinchen tanto a pH ácido como a pH básico. La generación de un hidrogel, formado inicialmente mediante la formación de un complejo polielectrolito entre el poliácido acrílico y el quitosano (mediante una reacción de polimerización a templado del ácido acrílico vía radicales libres en medio acuoso) es un ejemplo de este tipo de materiales. En la figura N°6 se muestra su comportamiento de hinchamiento en función del pH en el medio externo.

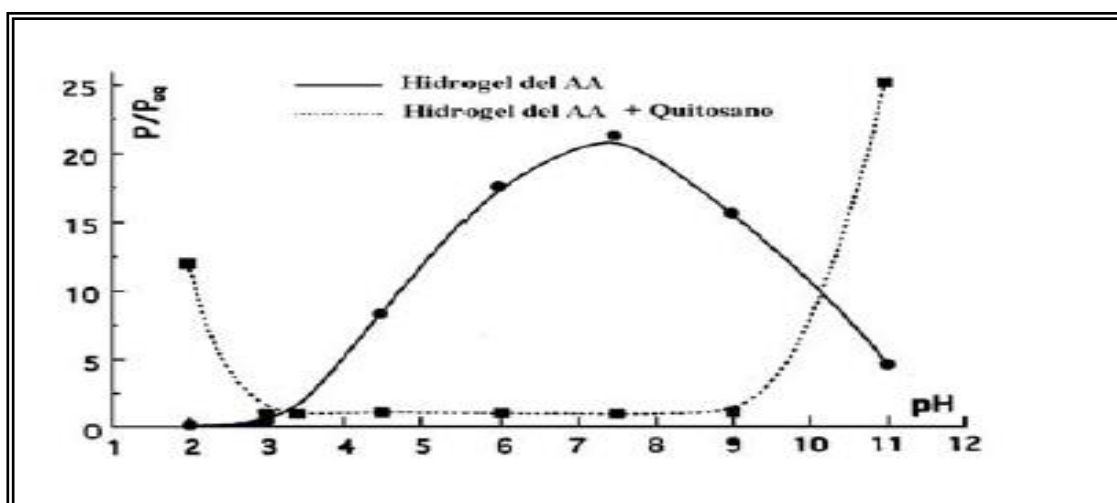


Figura N° 6: Comportamiento en el hinchamiento como función del pH para el sistema ácido acrílico (AA) y quitosano. (Tomado de [2])



Figura N° 7: Fotografías de (a) hidrogel no hinchado basado en un complejo polielectrolito de quitosano y ácido itacónico y (b) el mismo hidrogel de (a) hinchado en medio ácido. (Tomado de [2])

La figura N° 7 muestra las fotografías del hidrogel obtenido del complejo polielectrolito formado por la polimerización a templado ácido itacónico y el quitosano, usando cantidades relativamente bajas del policatión [17]. La realización de esta experiencia ha permitido confirmar que la interacción electrostática entre ambos polielectrolitos puede llegar a ser bastante significativa, como para producir un entrecruzamiento físico, aun cuando uno de ellos se encuentre en cantidades iniciales tan pequeñas como el 1,1% de los grupos cargados en el polielectrolito en exceso. Por debajo de estas cantidades los materiales obtenidos son completamente solubles, como puede inferirse de la tabla N°1.

Muestra	$M_v \times 10^{-5}$ g/mol	$M_w \times 10^{-5}$ g/mol	$M_n \times 10^{-5}$ g/mol	Polidispersidad	$R_{initial}$	R_{final}	Rendimiento (g) %	
PIA-D	5,4	5,6	5,0	1,12	-	-	0,39	13
PIACH-E	5,3	5,4	4,7	1,14	305,4	38,3	0,36	12
PIACH-F	6,1	6,7	5,0	1,30	152,6	15,4	0,77	25
PIACH-G	8,6	10,0	5,7	1,74	119,8	19,3	1,01	32
PIACH-H	-	-	-	-	76,4	8,6	1,23	39

$$R = (\text{meq. COOH}/\text{meq. NH}_2)$$

Tabla N°1: Masas molares promedios, polidispersidad, relación COOH/NH₂ y rendimiento de los policomplejos obtenidos en la polimerización a templado de ácido itacónico en soluciones acuosas de quitosano.

También en la biomedicina los polielectrolitos tienen un amplio potencial de aplicaciones en ciencias de la salud, en la administraciones de fármacos [18] o la ingeniería de tejidos [19-20], ya que los polisacáridos son generalmente considerados como seguros, biocompatibles y exhiben una variedad de propiedades adecuadas para aplicaciones biomédicas. Los polielectrolitos son los polímeros que llevan grupos ionizables. Estos grupos se disocian en soluciones acuosas que conducen a cadenas y contraiones del polímero cargado, dispersos o nanoestructuradas en la solución. Esta especificidad de polielectrolitos polisacárido ha sido ampliamente utilizada ya que pueden formar complejos con sales [21], proteínas [22] u otros polielectrolitos [23].

2.1.2.2 Reacción de entrecruzamiento.

Los hidrogeles químicos son redes tridimensionales formadas por la unión covalente de todas las cadenas de polímeros existentes en un sistema determinado, hasta formar, teóricamente, una sola macromolécula. El quitosano es uno de los biomateriales más extensamente estudiados en este sentido. Existen varios agentes entrecruzantes que han sido estudiados para tal fin, como por ejemplo la epíclorhidrina y el etilenglicol glicidil éter. Pero quizás la reacción de entrecruzamiento más frecuentemente utilizada para este fin es la reacción con dialdehídos para formar uniones químicas tipo base de Schiff [24]. Las bases de Schiff (II) son especies generadas a partir de reacciones reversibles; sin embargo, estas especies pueden ser convertidas en materiales más estables (III) mediante una reacción de hidrogenación con reactivos comunes como el cianoborohidruro de sodio, de acuerdo con el siguiente esquema:

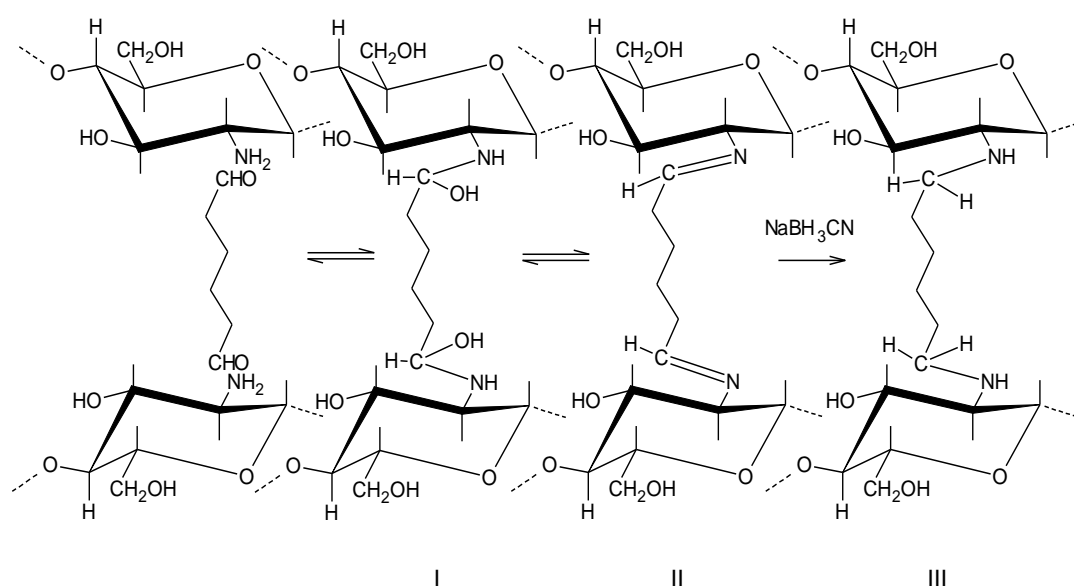


Figura N° 8: Reacciones de entrecruzamiento para producir hidrogeles de quitosano usando un dialdehído como agente entrecruzante.

Obviamente un polímero con grupos aldehídos es candidato obligado para la preparación de este tipo de hidrogeles, especialmente si dicho material proviene de fuentes naturales como el biopolímero denominado scleroglucano (Polytran, Biopolímero CS), el cual es secretado por hongos del género *Sclerotium*, entre otros. Este material ha sido oxidado exitosamente a un derivado conocido como sclerodialdehído mediante la conocida reacción de grupos hidroxilo vecinales con periodato de sodio. Posteriormente, a través de una reacción similar a la mostrada en el esquema anterior, se ha logrado producir un hidrogel que ha sido estudiado en sus propiedades de hinchamiento en función del pH del medio, absorción de compuestos aniónicos como el ácido salicílico, cationes metálicos y también su interacción con surfactantes, donde fue posible observar el llamado colapso del sistema [25]. La figura N° 10 muestra el perfil de liberación en el tiempo del surfactante dodecilsulfonato de sodio (SDSS) y el compuesto de comparación, p-toluen sulfonato de sodio (p-TSS), mientras que en la figura N°9 podemos observar las respectivas isoterms de absorción.

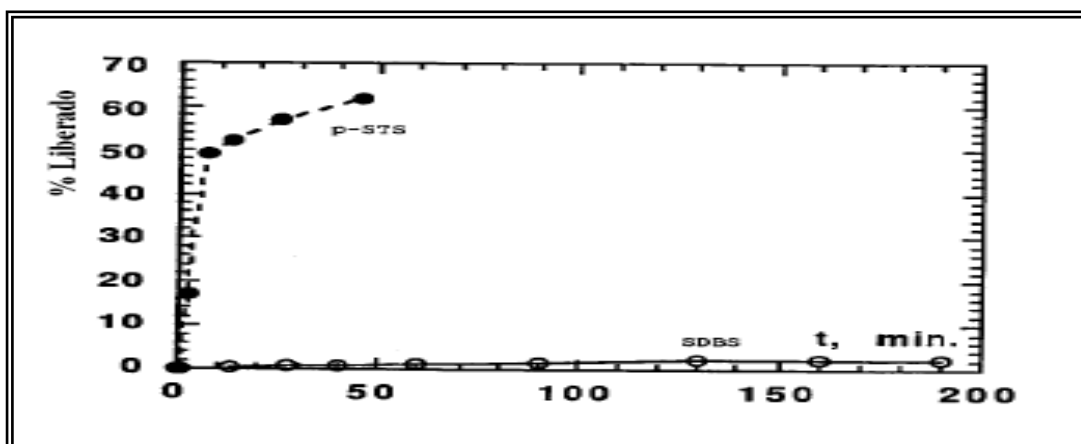


Figura N° 9: Perfil de liberación en el tiempo del surfactante SDSS y del compuesto de comparación p-TSS. (Tomado de [2])

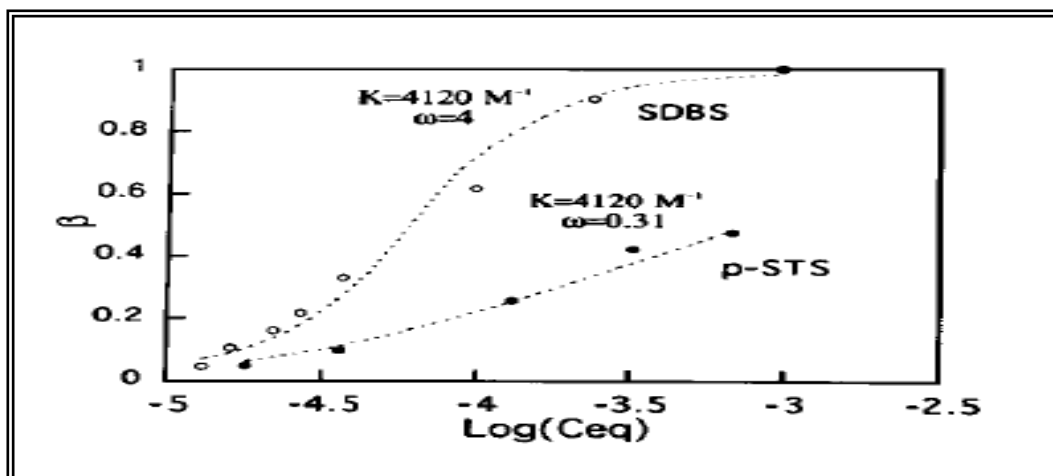


Figura N°10: Isotermas de absorción para el SDSS y el p-TSS en un hidrogel de quitosano sclerodialdehído. (Tomado de [2])

También ha sido posible obtener hidrogeles de este tipo, usando quitosano, mediante una serie de modificaciones químicas sumamente interesantes en un polímero sintético como el polivinil alcohol (PVA) [26]. Este último fue inteligentemente modificado aprovechando que normalmente en su cadena pueden encontrarse, distribuidas al azar, uniones cola-cola que generan grupos OH vecinales; estos grupos vecinales pueden ser oxidados a grupos aldehídos, los que a su vez pueden formar bases de Schiff con el quitosano, etc.

La formación de redes tridimensionales con quitosano también se han realizado con diversos agentes entrecruzantes macromoleculares, como por ejemplo mediante reacciones de injerto del poliácido acrílico a través del grupo amina [27].

2.1.2.3 Cuaternización (alquilación exhaustiva del grupo amino)

Debido a que el quitosano posee un valor del $pK_a \sim 5,6$, siendo soluble solo en soluciones ácidas con valores de $pH < 6$, se ha venido buscando extender el intervalo

de pH donde se pueda utilizar dicho biopolímero en solución, para darle una mayor aplicabilidad. En ese sentido, un material con una mayor densidad de carga generaría seguramente una mayor solubilidad; por ello, una de las rutas propuestas para lograr este objetivo es lograr una alta eficiencia en la cuaternización de los grupos aminos en las cadenas del polímero. Existen diversos métodos de cuaternización de grupos amino primario y secundario, algunos de los cuales ya se han aplicado con éxito al quitosano, obteniéndose diferentes derivados alquilados. Se ha logrado comprobar experimentalmente que el grado de cuaternización y su porcentaje pueden ser controlados mediante el número de pasos de la reacción, el tiempo de duración de dichos pasos y la concentración del agente alquilante.

Uno de los métodos más usados para realizar esta modificación hace uso de la preparación de intermediarios monoalquilados tipo base de Schiff's para su posterior alquilación exhaustiva usando yoduro de metilo. Normalmente los productos obtenidos mejoran sustancialmente su solubilidad en agua con relación al quitosano virgen. Estos materiales han mostrado actividad antibacterial sobre *S. Aureus*, habiéndose notado un incremento de dicha actividad conforme aumenta el tamaño de la cadena alquilante [28]. También Jia y colaboradores sintetizaron y estudiaron derivados cuaternizados del quitosano en su acción antibacterial sobre *E. Coli* [29], demostrando que esta es mayor para altos pesos moleculares y apreciándose mayor efectividad para sustituyentes alquilo con mayores longitudes de cadena.

Una aplicación sumamente interesante de los derivados cuaternizados del quitosano es la que pudiera derivarse de las prometedoras propiedades de transporte de compuestos hidrofílicos, a través de monocapas de células intestinales de Caco-2,

que ha exhibido el trimetil-quitosano (TMC). Thanou y colaboradores [30], han observado que este polímero es capaz de abrir las uniones compactas del epitelio intestinal a valores de pH fisiológico, donde el quitosano es insoluble, y por lo tanto, inefectivo. Han sugerido que la alta densidad de carga del TMC es necesaria para mejorar sustancialmente la permeabilidad paracelular del epitelio intestinal; se espera a corto plazo que este material refuerce la permeación de drogas macromoleculares hidrófilas como, por ejemplo, los péptidos y las proteínas. Otros investigadores han confirmado estos resultados.

En otro tipo de aplicación, de los derivados cuaternizados del quitosano han sido utilizados también como agente floculante en el tratamiento de aguas de desecho que contienen glutamato de sodio [31] mostrando alta eficiencia en la remoción de la turbidez en un intervalo amplio de pH. Por su parte, Kim y colaboradores [32] también han sintetizado una serie de derivados cuaternizados que han mostrado un alto poder floculante, independientemente del valor del pH; aparentemente el poder floculante incrementa con el tamaño de la cadena alquílica.

En los laboratorios se trabaja actualmente en la metilación exhaustiva del quitosano y su caracterización (véase la figura 11 (a) con los espectros de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) de la especie obtenida) habiéndose ensayado algunos de los materiales obtenidos en la floculación de kaolinita y polvo de tierra en agua desmineralizada y en agua del grifo. Existe una mejoría que se manifiesta en la solubilidad de los materiales cuaternizados, así como también se ha confirmado su comportamiento de polielectrolito fuerte cuando se realizan estudios de

viscosimetría y se comparan con los del material de partida, en las mismas condiciones de pH, tal como puede observarse en la figura N° 11 (b).

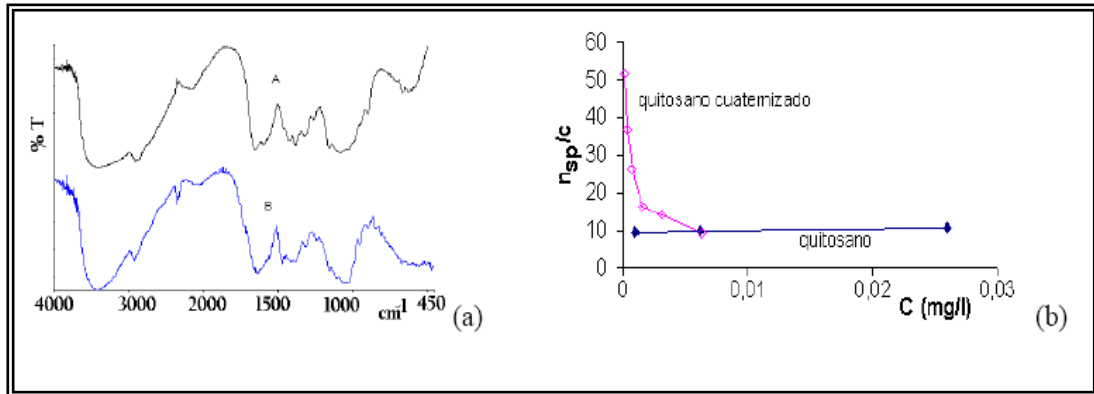


Figura N° 11: (a) Espectros FTIR y (b) Comportamiento viscosimétrico del quitosano utilizado y del derivado cuaternizado (TMC). (Tomado de [2])

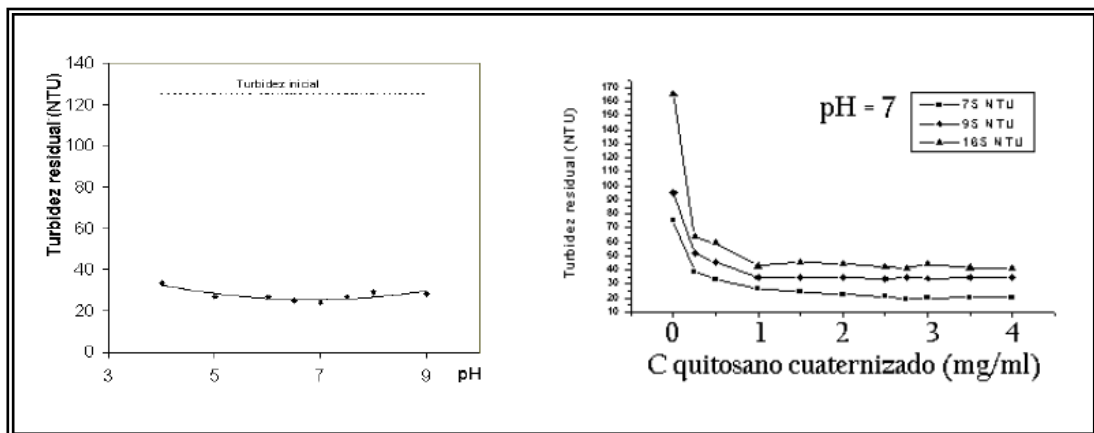


Figura N° 12: (a) Variación de la turbidez como función del pH del medio y (b) de la concentración de TMC añadido para una muestra de caolinita en agua del grifo. (Tomado de [2])

La figura N° 12, por su parte, muestra los valores de turbidez antes y después del proceso de floculación inducido por la presencia de TMC, a diferentes valores de pH, incluyendo valores mayores que 6,5 como puede apreciarse.

Finalmente es importante mencionar que en la actualidad se han iniciado algunos estudios para la modificación de pasta de carbono con quitosano, con el fin de

aprovechar sus propiedades de agente quelante y su posible selectividad en la determinación de metales. Los ensayos iniciales con mezclas físicas han mostrado que es necesario fijar químicamente el quitosano a las partículas de carbón, debido a que su alta hidrofilia (en medio ácido) hace difícil retenerlo dentro de la pasta en estas condiciones [33].

2.1.3 Aplicaciones

Dado el gran número de trabajos que existen sobre este versátil material es conveniente realizar una clasificación por área sobre las aplicaciones que se le han ido dando. A continuación se presentan algunas de ellas, aunque la lista no pretende ser exhaustiva.

2.1.3.1 Química analítica

Aplicaciones cromatográficas, intercambiadores de iones, absorción de iones de metales pesados y absorción de ácidos, fabricación de electrodos específicos para metales, etc.

2.1.3.2 Biomedicina

Membrana de hemodiálisis, suturas biodegradables, sustituyentes artificiales de la piel, agente cicatrizante en quemaduras, sistemas liberadores de fármacos, liberación de insulina, transporte de agentes anticancerígenos, tratamiento de tumores (leucemia), control del virus del SIDA, etc.

2.1.3.3 Agricultura y ganadería

Recubrimiento de semillas para su conservación durante el almacenamiento, sistemas liberadores de fertilizantes, aditivo para alimento de animales, en formulación de pesticidas, etc.

2.1.3.4 Cosméticos

Espumas de afeitar, cremas para la piel y el cuerpo.

2.1.3.5 Dietéticos

Adelgazantes (existe una amplia variedad de productos comerciales que ofrecen el polímero como atrapador de grasas en el estómago, véase figura N°13).

2.1.3.6 Industrias

Del papel, textil, alimentaria (soporte para inmovilización de enzimas en la producción de maltosa, espesante en alimentos, agente de oxidación controlada, agente preservante).



Figura N° 13: Algunos productos del quitosano de uso dietético y cosmético que se encuentran en el mercado.

2.1.3.7 Tratamiento de aguas

Agente floculante, agente coagulante, tratamientos de flotación para la remoción de aceite de pescado en agua [34], agentes filtrantes para piscinas y spas, remoción de metales, remoción de surfactantes, etc.

Como resumen, en la figura N° 14 se muestra las distintas aplicaciones del quitosano.

➤ **Tratamiento de agua:**



Crustáceos

Carne

Desechos de proteínas

Conchas

Productos congelados

Productos enlatados

Cremas, salsas

Alimentos de peces

Quitina

- Desproteínización
- Desmineralización
- Decoloración



Desacetilación

Quitosano

Cosméticos

Agricultura

Tratamiento de agua

Medicina

Biosensores



Jabón

Adelgazante

Fungicida

Coagulante

Banda adhesiva

Biosensor

Figura N°14: Esquema general para el aprovechamiento de crustáceos en el desarrollo de aplicaciones de sus subproductos quitina y quitosano.

Los distintos tipos de micropartículas de quitosano (quitosano, quitosano entrecruzado con glutaraldehído (QE) quitosano cuaternizado (QC), quitosano cuaternizado entre cruzado con glutaraldehído (QCE)), fueron obtenidos de diferentes maneras: primero el QE se ha obtenido con la ayuda de un entrecruzante como el glutaraldehído (GL). El polímero fue caracterizado por espectroscopia IR, XRD y TGA. Segundo el QC fue obtenido con la ayuda de un cuaternizante como cloruro de glicidil trimetil amonio (CTAG). El polímero fue caracterizado por espectroscopia IR, XRD, TGA y valoración conductimétrica para determinar la cantidad de grupos amonio cuaternario y tercero el QCE fue obtenido partiendo del QC. El polímero fue caracterizado por espectroscopia IR, DRX, TGA.

También se caracterizó previamente al quitosano utilizado para la síntesis. Determinándose el peso Molecular viscosimétrico, los grupos funcionales característicos (IR) y el porcentaje de desacetilación por el método potenciométrico.

2.1.4 Quitosano como adsorbente.

Los polímeros naturales, tales como celulosa, agarosa, dextrano y quitosano se han utilizado con frecuencia como material absorbente [35]. El quitosano un polímero orgánico que existe ampliamente en la naturaleza, es un polisacárido hidrófilo y biocompatible [36-37]. Sus grupos amino e hidroxilo proporcionan sitios activos de reacción, para el fácil acoplamiento de diversos grupos funcionales para introducir propiedades deseadas. Quitosano natural ha sido modificado por varios métodos (ya sea física o químicamente) con el fin de mejorar la capacidad de adsorción, se han realizados diferentes tipo de reacciones, como por ejemplo formación de

policomplejos [38-39], de entrecruzamiento [40-41] y cuaternización (alquilación exhaustiva del grupo amino). [42-43]

El uso del ADN contenido en muestras de orina para el diagnóstico de algunas infecciones parasitarias, entre las que se incluyen: malaria, toxoplasmosis, amebiasis, trichomoniasis, leishmaniasis, tripanosomiasis, es una técnica muy importante , aunque presenta algunas desventajas debido a que el material genético contenido está presente en baja concentración no detectable por métodos convencionales [44]. La alternativa más plausible es el uso de material polimérico como el quitosano, el cual debido a la presencia de grupos amino en la cadena polimérica y mediante su modificación química puede incrementar la eficiencia de sus uniones aniónicas con el ADN.

En los últimos años se ha demostrado que el quitosano es un potencial portador de un gen policationico, este polisacárido biodegradable se une eficazmente al ADN en solución salina o solución de ácido acético protegiéndolo de la degradación por nucleasas. Varios derivados de quitosano han sido preparados con base en las reacciones con los grupos amino libres. Por ejemplo, el quitosano trimetilada se prepara con diferente grado cuaternización para aumentar la solubilidad del quitosano a pH neutro [45]; grupos quitosano desoxicólico conjugados se sintetiza para desarrollar un vehículo coloidal para el ADN [46]; también tanto quitosano y quitosano cuaternizado desoxicolato modificado se ha demostrado que transfectar células COS-1 con eficacia in vitro. A quitosano lactosilado también se ha demostrado ser capaz de formar un complejo con el ADN y transfectar eficazmente las células HeLa. Todos

estos estudios señalan la versatilidad y la promesa del quitosano como un portador de gen el cual se ha demostrado, aunque sólo se limita la eficacia in vivo.

Por otro lado el quitosano también es empleado como adsorbente de metales pesados debido a la capacidad para formar complejos con distintos iones metálicos [47]. La comparación entre los diferentes estudios realizados es complicada debido a la gran variabilidad de condiciones experimentales empleadas en la sorción de metales. Este polímero se caracteriza por poseer un elevado número de grupos aminos libres que son muy reactivos para la quelación de cationes metálicos a pH más o menos neutros [48].

Modificaciones físicas y químicas se han desarrollado para mejorar su calidad, capacidad y selectividad adsorbente del quitosano. Por ejemplo la cuaternización del grupo amino y el entrecruzamiento con glutaraldehído para mejorar su resistencia y estabilidad en medios ácidos.

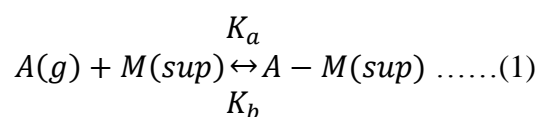
2.1.4.1 Isotermas de adsorción

Se han desarrollado varios modelos de equilibrio para describir la relación de las isotermas de adsorción. Ningún modelo ha demostrado ser aplicable de manera general: aquel que representa de manera precisa un sistema particular, bajo determinadas condiciones de operación, falla completamente al variarlas. Fenómeno completamente comprensible si se tienen en cuenta las suposiciones asociadas a sus respectivas deducciones. Sin embargo, los dos modelos más usados en bibliografía son el de Langmuir y el de Freundlich.

Isoterma de Langmuir.

En 1918 I. Langmuir dedujo una isoterma empleando un modelo simplificado de la superficie de un sólido:

- La superficie proporciona un cierto número de posiciones para la adsorción y todas son equivalentes.
- sólo se adsorbe una molécula sobre cada posición.
- su adsorción es independiente de la ocupación de las posiciones vecinas (las moléculas adsorbidas no interaccionan entre sí). El proceso dinámico de adsorción se puede plantear como:



K_a : Constante de velocidad para la adsorción

K_b : Constante de velocidad para la desorción.

Para expresar el grado de extensión de la adsorción se introduce la fracción de recubrimiento. Teniendo en cuenta que sobre cada posición sólo puede adsorberse una molécula:

$$\theta = \frac{n^{\circ} \text{moléculas adsorbidas}}{n^{\circ} \text{posiciones adsorción}} = \frac{n^{\circ} \text{posiciones ocupadas}}{n^{\circ} \text{posiciones adsorción}(N)} \dots\dots(2)$$

Dónde: N es el número total de posiciones de adsorción en la superficie. En un instante t se cumple:

- Número de posiciones de adsorción ocupadas = θN
- Número de posiciones de adsorción libres = $N - \theta N = N(1 - \theta)$

Si consideramos una cinética de primer orden respecto a cada miembro, se obtiene que la velocidad de adsorción es proporcional al número de colisiones entre las moléculas de la fase gaseosa (o líquida) y las posiciones de adsorción vacías, ya que sólo se forma una monocapa:

$$V_a = K_a P(1 - \theta)N \dots (3)$$

La velocidad de desorción será proporcional al número de moléculas adsorbidas

$$V_d = K_d N \theta \dots (4)$$

Las dos velocidades se igualan al llegar al equilibrio, de donde se obtiene:

$$K_a P N (1 - \theta) = k_d N \theta \dots (5)$$

$$K_a P - K_a P \theta = K_d \theta \dots (6)$$

Si despejamos la fracción de recubrimiento:

$$\theta = \frac{K_a P}{K_d + K_a P} \dots (7)$$

Definiendo la constante de equilibrio como $K=K_a/K_d$ se obtiene la isoterma de Langmuir:

$$\theta = \frac{NP}{1+NP} \dots\dots(8)$$

Alternativamente, esta expresión puede deducirse a partir del equilibrio entre productos (posiciones ocupadas) y reactivos (posiciones libres y moléculas en fase gas):

$$K = \frac{N\theta}{N(1-\theta)P} \dots\dots(9)$$

Que, reordenando, conduce a la expresión anterior.

Experimentalmente, el grado de recubrimiento puede obtenerse por la relación entre el volumen de gas adsorbido a la presión P y el volumen adsorbido cuando la monocapa esta sobresaturada, es decir, cubre totalmente la superficie:

$$\theta = \frac{V}{V_{mon}} \dots\dots(10), \text{ o también: } q_e = \frac{Q^0 b C_e}{1+b C_e}$$

Donde Q^0 es la concentración de adsorbato por peso unitario de adsorbente que forma una monocapa completa en la superficie, es decir, la capacidad límite de adsorción; y b, una constante del modelo, también llamada coeficiente de adsorción, que se encuentra relacionada con la entalpía de adsorción

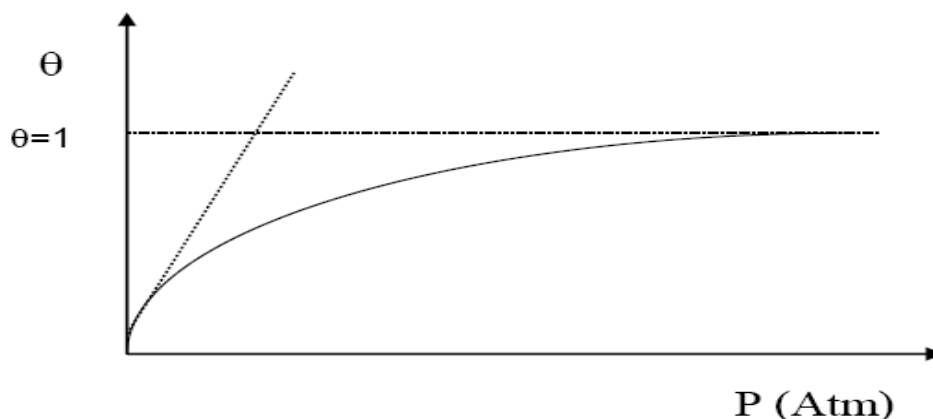


Figura N° 15: Isoterma de adsorción de Langmuir

En función de la presión se obtiene:

$$-P = 0 \quad \Rightarrow \quad \theta = 0$$

$$-P \downarrow \quad \Rightarrow \quad \theta = 0$$

$$-P \uparrow \quad \Rightarrow \quad \theta \rightarrow 1$$

.....(11)

La isoterma de Langmuir puede linealizarse para comprobar más fácilmente si el comportamiento experimental se ajusta a esta expresión:

$$\theta = \frac{V}{V_{mon}} = \frac{KP}{1+KP} \dots\dots(12),$$

Dando la vuelta a la ecuación y multiplicando por $1/V_{mon}$ se obtiene:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{KV_{mon}P} + \frac{1}{V_{mon}} \dots\dots(13), \text{ o también: } \frac{1}{q_e} = \frac{1}{Q^o} + \frac{1}{bQ^oC_e}$$

Es decir, al representar $1/V$ frente a $1/P$ la ordenada en el origen nos da $1/V_{mon}$ y la pendiente $1/(KV_{mon})$ tal como se muestra en la siguiente figura. [49-50]

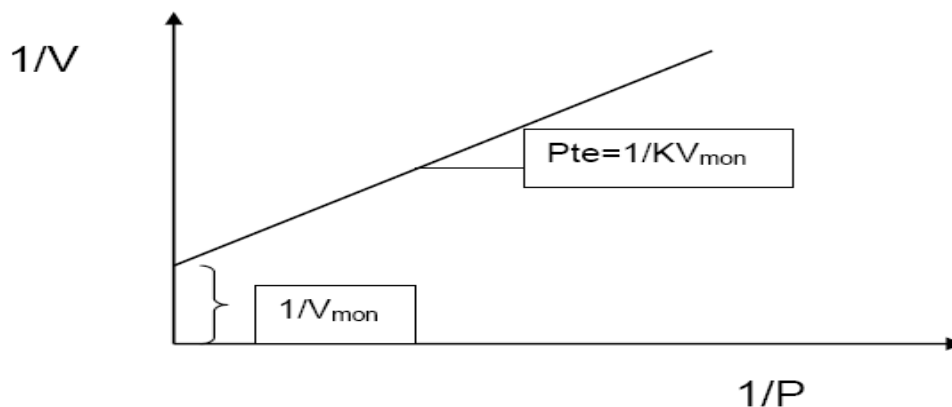


Figura N° 16: Linealización de la isoterma de Langmuir

Isoterma de Freundlich

Una de las isotermas empíricas más utilizadas es la propuesta por Freundlich a finales del siglo XIX:

$$\theta = KP^n \dots\dots(14), \text{ o también: } q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}}$$

Donde, K_F y n son constantes características del sistema. Éste es un modelo empírico, aunque se admite que K_F es una indicación aproximada de la capacidad de sorción y $1/n$, de la intensidad de sorción.

Se puede derivar teóricamente una expresión de este tipo suponiendo que la superficie contiene diferentes tipos de centros de adsorción. Los parámetros de ajuste k y n (normalmente entre 1 y 10) son constantes. Se pueden obtener del ajuste lineal de la expresión en forma logarítmica:

$$\log \theta = \log k + \frac{1}{n} \log P \dots (15), \text{ o también: } \log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e$$

La representación de $\ln \theta$ frente a $\ln P$ permite obtener n de la pendiente y k de la ordenada en el origen.

Esta isoterma no es válida para presiones altas pero es más precisa que la de Langmuir a presiones intermedias. Se utiliza para describir la adsorción de solutos sobre sólidos. [51]

2.1.5 Técnicas de caracterización.

2.1.5.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

El Microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscope) [52], es aquel que utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen. Tiene una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra. También produce imágenes de alta resolución, que significa que características espacialmente cercanas en la muestra pueden ser examinadas a una alta magnificación. La preparación de las muestras es relativamente fácil pues la mayoría de SEMs sólo requieren que estas sean conductoras.

En el microscopio electrónico de barrido la muestra es recubierta con una capa de carbón o una capa delgada de un metal como el oro para darle propiedades conductoras a la muestra. Posteriormente es barrida con los electrones acelerados que viajan a través del cañón. Un detector mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad de la zona de muestra, siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones, proyectados en una imagen de TV o una imagen digital. Su resolución está entre 3 y 20 nm, dependiendo del microscopio. Inventado en 1931 por Ernst Ruska, permite una aproximación profunda al mundo atómico. Permite obtener imágenes de gran resolución en materiales pétreos, metálicos y orgánicos. La luz se sustituye por un haz de electrones, las lentes por electroimanes y las muestras se hacen conductoras metalizando su superficie.



Figura N° 17: Microscopio electrónico de barrido.

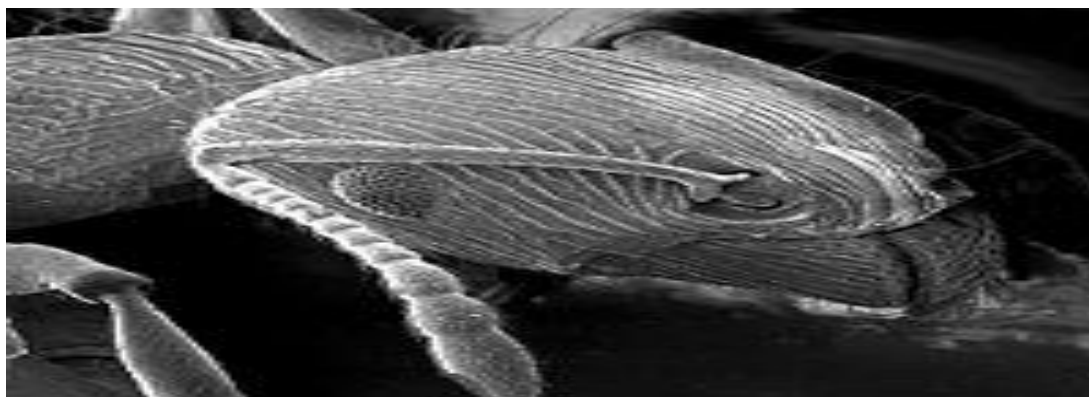


Figura N° 18: Cabeza de hormiga vista con un SEM.

2.1.5.2 Análisis Termogravimétrico (TGA)

En un análisis termogravimétrico [53] se registra, de manera continua, la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada, o bien en función de la temperatura, o bien en función del tiempo. En el primer caso (experimento dinámico) la temperatura de la muestra va aumentando de manera controlada (normalmente de forma lineal con el tiempo), y en el segundo (experimento isoterma), la temperatura se mantiene constante durante todo el experimento. La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo o de la temperatura se denomina termograma o curva de descomposición térmica. Existen otros tipos de análisis denominados de termogravimetría diferencial donde se registra o representa la variación de masa o derivada con respecto a la temperatura o respecto al tiempo dependiendo de que el experimento sea dinámico o isoterma respectivamente. En la Figura N°19 se representan estos dos tipos de termograma: a) convencional; b) diferencial.

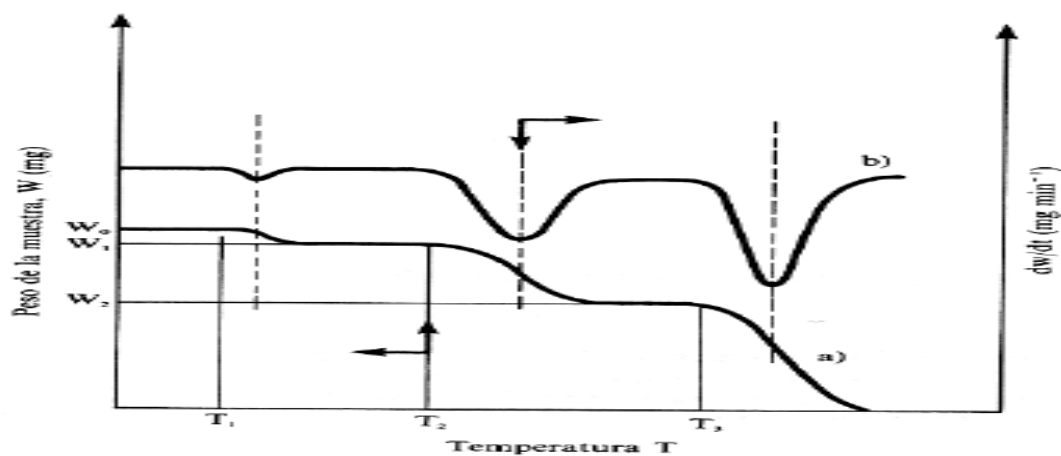


Figura N° 19: Termogramas diferencial (curva superior, eje derecho) y convencional (curva inferior, eje izquierdo). Figura tomada de: D.A. Skoog et al. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw Hill, Madrid (2002).

■ Aplicaciones

Los métodos termogravimétricos están limitados por las reacciones de descomposición y de oxidación y por procesos tales como la vaporización, la sublimación y la desorción.

Quizás, entre las aplicaciones más importantes de los métodos termogravimétricos se encuentre el estudio de polímeros. Los termogramas proporcionan información sobre los mecanismos de descomposición de diversas preparaciones poliméricas. Además, los modelos de descomposición son característicos de cada tipo de polímero y, en algunos casos, pueden ser utilizados con finalidades de identificación. La Figura N° 20 muestra los modelos de descomposición de cinco polímeros obtenidos por termogravimetría.

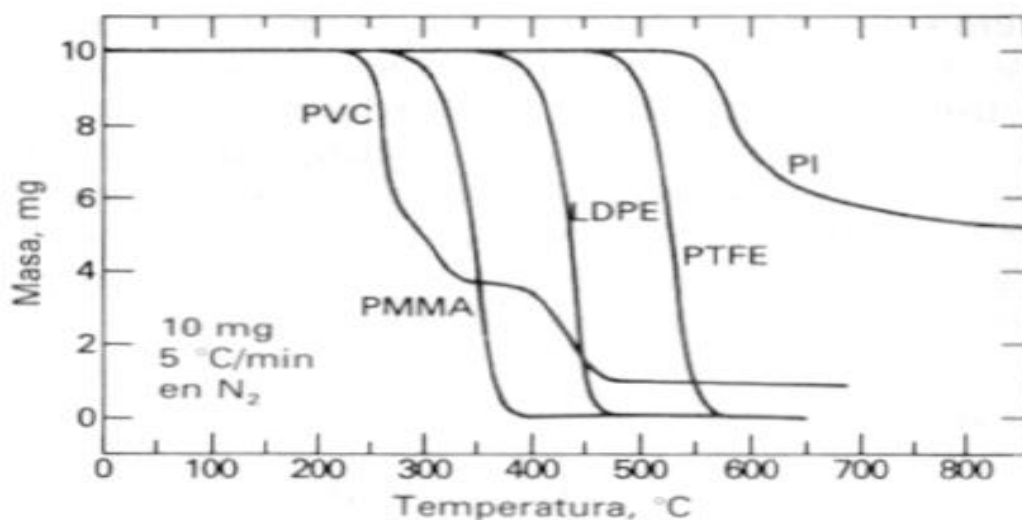


Figura N° 20: Termogramas correspondientes a la descomposición de cinco polímeros. (Figura tomada de: D.A. Skoog et al. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw Hill, Madrid, 2002).

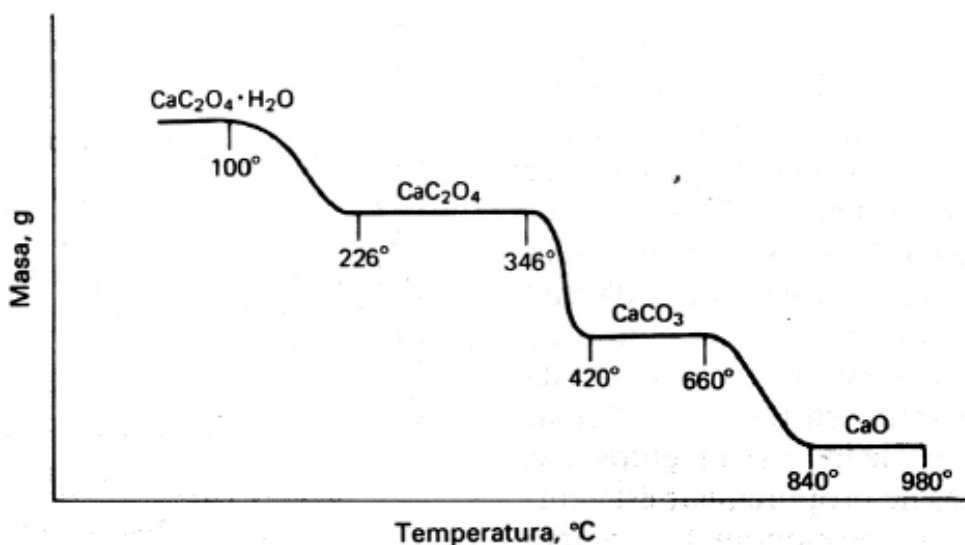


Figura N° 21: Termograma del oxalato cálcico monohidratado. Figura tomada de: D.A. Skoog et al. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw Hill, Madrid (2002).

La Figura N° 21 muestra el termograma que se ha obtenido al aumentar la temperatura del oxalato cálcico monohidratado puro ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) a una velocidad de $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. Las regiones horizontales perfectamente definidas corresponden a los intervalos de temperatura en los que los compuestos de calcio

son estables. Esta figura ilustra una de las aplicaciones más importantes de la termogravimetría que es el establecimiento de las condiciones térmicas necesarias para obtener la forma pura adecuada para la determinación gravimétrica de una especie.

2.1.5.3 Difracción de rayos x en polímeros (DRX)

- Introducción

Los métodos de difracción y dispersión, especialmente la difracción de rayos X, constituyen las técnicas más poderosas para el estudio del estado sólido de polímeros. En general, la mayor parte de la información útil se obtiene en polímeros que forman fibras orientadas, son microcristalinos o están constituidos por cristales simples (monocristales).

Los experimentos realizados con difracción de rayos X, dan lugar a los siguientes tipos de información:

- i. Estimación del grado de cristalinidad de la muestra
- ii. Determinación de la orientación de los cristales
- iii. Análisis de la “macroestructura del polímero. Es decir, la forma en la que se empaquetan los cristales y los bucles de las cadenas
- iv. Determinación de la estructura molecular, incluyendo la conformación de la cadena y la posición de los átomos individuales.

Estos estudios son los más complicados pero también los que proporcionan mayor cantidad de información fundamental. [54]

- Difracción de rayos X.

Los rayos X se generan cuando un haz de electrones de alta energía incide en una superficie de un metal (generalmente cobre, molibdeno o hierro). El haz de rayos X generado posee un espectro que consta de dos partes, una banda ancha de radiación continua y unas líneas características, llamadas $K\alpha$, $K\beta$, $L\alpha$, etc. Estas líneas pueden ser separadas por filtros apropiados para obtener radiación de rayos X monocromática. La cantidad de radiación absorbida por la muestra viene dada por el coeficiente de absorción (μ), mediante una ecuación del tipo de Lambert-Beer.

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\mu l} \dots (20)$$

Donde:

I_0 : es la intensidad del haz incidente

I : la del haz transmitido

l : es el espesor de la muestra.

μ : el coeficiente de absorción lineal.

Cuando un haz de rayos X monocromáticos incide en una muestra pueden observarse dos tipos de procesos:

- i. Si la muestra tiene una estructura periódica (regiones cristalinas), los rayos X resultantes son coherentes. El proceso ocurre sin cambio en la longitud de onda y sin pérdida de fase entre los rayos incidente y transmitido. Este efecto da lugar a la técnica de Difracción de rayos X de ángulo ancho (WAXD, Wide Angle X-ray Diffraction).
- ii. Si la muestra no es periódica y posee regiones de diferente densidad electrónica (regiones cristalinas y amorfas), el haz transmitido no es coherente. El proceso ocurre con cambios en la fase entre los rayos incidente y transmitido. Este efecto se estudia por la técnica de difracción de rayos X a ángulo bajo (SAXD, Small Angle X-ray Diffraction). Una red cristalina se puede considerar como una familia de planos que se extiende a través de los átomos que la forman. Estos planos se especifican cristalográficamente mediante un conjunto de tres números (hkl), llamados índices de Miller. La radiación ondulatoria incidente se supone que es reflejada por estos planos. El espaciado entre un conjunto de planos adyacentes, d_{hkl} , (con índices de Miller (hkl)), se puede calcular a partir de la relación de Bragg:

$$n\lambda = 2 * d_{hkl} * \sin \theta \dots\dots(21)$$

Donde:

n: es el número de orden (0, 1, 2, 3,...).

λ : es la longitud de onda de los rayos X.

θ : es la mitad del ángulo que forman el haz incidente y el difractado. La geometría de la difracción de rayos X.

Se muestra en la Figura N. Cada conjunto de planos da lugar a una serie de diagramas de difracción, a partir de los cuales pueden determinarse las distancias entre ellos. [55]

- Aplicaciones a la caracterización de polímeros.

- i. Determinación de la estructura cristalina

Las estructuras cristalinas de polímeros se determinan empleando los métodos usuales de rayos X, aunque la interpretación de los resultados experimentales es mucho más difícil que en el caso de cristales de moléculas más simples. Las razones de esta dificultad son varias. Primeramente, para la mayoría de los polímeros, no pueden obtenerse grandes cristales con la suficiente perfección, eliminándose así la utilización de un número de técnicas difractométricas modernas. En segundo lugar, debido al débil enlace en ciertas direcciones, la intensidad disminuye rápidamente con 2θ , y el análisis debe efectuarse basándose solamente en unas pocas reflexiones y perdiendo así precisión. Por último, la localización exacta de los grupos laterales, dentro de la red cristalina, tiene un efecto pequeño en las intensidades difractadas, reduciendo la sensibilidad de la técnica. Debido a todas estas dificultades, lo que se hace normalmente, es diseñar un modelo estructural teórico, obtener por ordenador su diagrama de difracción y compararlo con el obtenido en la muestra a estudiar. Una vez que se consigue

una semejanza razonable, se hace un refinamiento posterior, para obtener la conformación de la cadena y la posición de los átomos y grupos laterales. La determinación de la estructura cristalina completa requiere una gran especialización y se emplea solamente al sintetizarse un nuevo polímero cristalino, aunque el diagrama de difracción de una muestra puede usarse como método de identificación del polímero del que se trate. En algunos casos, la difracción de rayos X se emplea para obtener información en ciertos sistemas poliméricos muy interesantes desde el punto de vista práctico. Por ejemplo, si tenemos una mezcla de polímeros (blend) puede haber una separación de fases de los dos polímeros que lo constituyen. Si uno o ambos cristalizan, puede ser estudiado por rayos X. En mezclas de polietileno y polipropileno se pueden detectar picos de difracción correspondientes a cristales de ambos polímeros, indicando que existe una separación de fases. Otro ejemplo de la aplicación de rayos X al estudio de sistemas poliméricos, lo constituye el caso de muestras polimórficas, en la que el polímero puede cristalizar en varias formas cristalinas. Este hecho se puede relacionar con las condiciones de cristalización, incluyendo las del procesado de un polímero comercial, o con una posterior modificación del material por diferentes procedimientos. Por ejemplo, el polietileno ortorrómbico se puede transformar en su modificación monoclinica mediante una deformación mecánica, y este hecho puede ser puesto de manifiesto por difracción de rayos X. Otra propiedad muy importante es la determinación del grado de orientación de los cristales en un polímero microcristalino. Esta orientación tiene una profunda influencia en las propiedades del material. Por ejemplo,

una buena orientación, paralela a la dirección de aplicación de una fuerza externa, puede generar una alta resistencia del material a la ruptura. La gran resistencia de las fibras de nylon se puede atribuir, en parte, a este efecto. La cristalografía de rayos X provee una forma conveniente para la estimación de este efecto.

ii. Grado de cristalinidad

El grado de cristalinidad de un polímero semicristalino se puede determinar mediante el análisis de la intensidad de la radiación de rayos X dispersada por la muestra. Para la medida de la intensidad es más conveniente utilizar un sistema detector difractométrico que una cámara fotográfica. En la Figura N°22 se muestra la intensidad de la radiación obtenida en una muestra de polietileno. Como vemos existen dos picos, que corresponden a las reflexiones de los planos de átomos (110) y (200), de los cristales ortorrómbicos del polímero. Estos picos son bastante anchos y existe una gran cantidad de radiación a valores de θ alejados de los mismos. Esto es debido a la dispersión por todo el material presente, incluyendo las zonas amorfas.

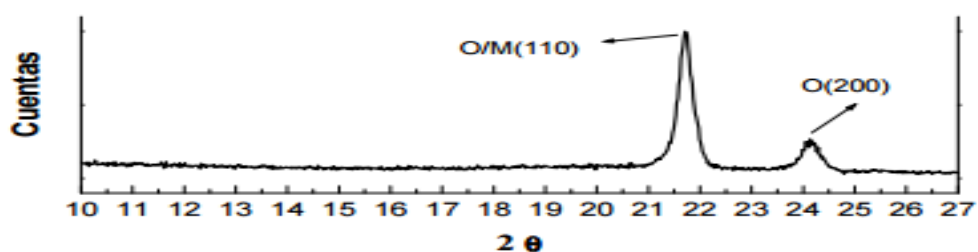


Figura N°22. Diffractograma de un polietileno de alta densidad.

Se puede suponer que la dispersión producida por un átomo es la misma, tanto si forma parte del cristal como si se encuentra en una zona amorfa. Las intensidades debidas a los átomos del cristal se suman, sumando una interferencia constructiva y dando lugar a un pico que satisface la condición de Bragg. En las zonas amorfas, la dispersión tiene lugar en todas direcciones, obteniéndose interferencias constructivas muy débiles y dando lugar a un pico muy difuso. Por ello la figura N°22 consta de una zona amorfa difusa y unos picos debidos a las zonas cristalinas. El grado de cristalinidad puede entonces relacionarse con estas dos zonas del diagrama de difracción, suponiendo que la relación entre la cantidad de material cristalino y amorfo es igual a la relación de la intensidad total (integrada) de la parte cristalina y amorfa del diagrama. Así, la fracción de cristalinidad, χ_c , viene dada por la ecuación:

$$\chi_c = \frac{I_c}{I_c - I_a} = \frac{\int_0^\infty s^2 I_c(s) ds}{\int_0^\infty s^2 I(s) ds} \dots\dots (22)$$

Dónde:

$s = (2 \sin \theta / \lambda)$,

$I(s)$: es la intensidad total dispersada.

$I_c(s)$: es la intensidad correspondiente a las zonas cristalinas.

I_a : la de las zonas amorfas.

Debido a que la ecuación anterior es simplemente una relación de intensidades, no tiene dimensiones y no es necesario conocer el factor correspondiente a la conversión de área a intensidad de rayos X. La mayor dificultad de este procedimiento es que, muchas veces, es difícil separar las intensidades correspondientes a ambas zonas. Solamente cuando se conoce bien la curva de la parte amorfa es posible obtener buenos resultados, ya que puede sustraerse de la curva total y obtener la correspondiente a las reflexiones del cristal [56].

Capítulo 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIALES

a. Reactivos

- Quitosano comercial en polvo (Marca ALDRICH) (GD - 81.3%)
- Cloruro de trimetil amonio glicidil (Marca ALDRICH) (95 %) (p.a)
- Acetona, J.T. BAKER (p.a)
- Etanol, (p.a) Merck
- Glutaraldehido, FERMONT (50%, p.a)
- Cromato de potasio, FERMONT (p.a)
- Ácido acético, (Marca ALDRICH) (p.a)
- Hidróxido de sodio, FERMONT (p.
- Nitrato de plata, FERMONT (p.a)
- Acetato de sódio, FERMONT (p.a)
- Tampones para la calibración del pH-metro (pH: 4.01 (rojo), 7 (amarillo) y 10.01 (azul)), FERMONT.

b. Equipos

- Espectrofotómetro FTIR (SHIMADZU, MODELO 1800)
- Nanodrop, (Thermo Scientific, MODELO 2000).
- Analizador de serie H (SHIMADZU, MODELO DTG-60)
- Difractómetro (BRUKER, MODELO AXSD8)
- Potenciómetro (ORION, MODELO 420A)
- Conductímetro (ORION, MODELO 142)
- Balanza analítica electrónica (DENVER INSTRUMENT MAX: 210g ± 0.0001g)
- pH-metro (INOLAB, MODELO 731)
- Viscosímetro de Ostwald
- Molinillo con cuchillo trituradora (BOSCH, MODELO MKM6003)
- Agitador magnético.
- Bomba de vacío.
- Centrífuga (EPPENDORF, MODELO 5810R)
- Liofilizador modelo 7740041 (LABCONCO, MODELO 7740041)
- Equipo de agua ultrapura (PURELAB CLASSIC, MODELO CLXXXUVM2)

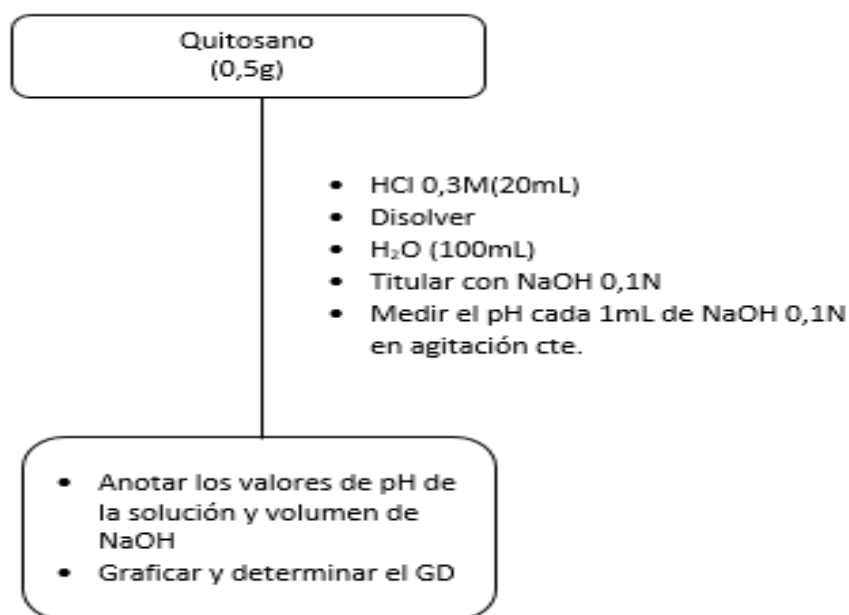
3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.2.1. CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO DE PARTIDA.

3.2.1.1. Determinación del grado de desacetilación por valoración potenciométrica:

Para determinar el grado de desacetilación (GD) se añadió 0.5 g de quitosano y 100mL de agua ultra pura a 20mL de HCl 0.3 M. Seguidamente se tituló con una solución de NaOH 0.1 M en constante agitación, midiendo el pH con un electrodo de vidrio cada 2mL de titulante agregado.

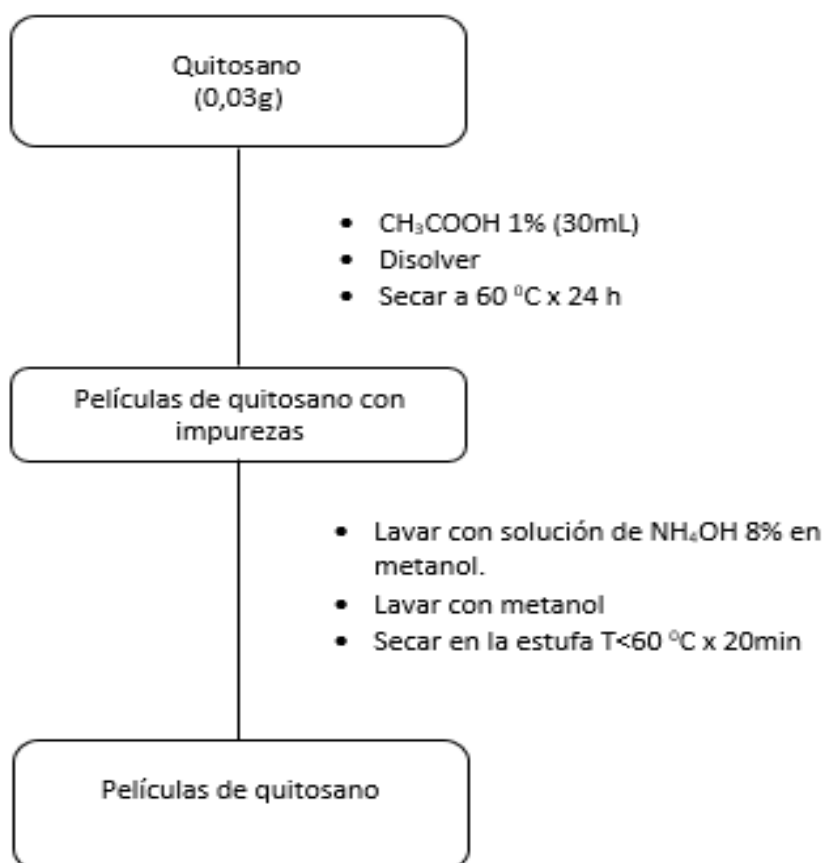
Diagrama de bloques.



3.2.1.2. Determinación del grado de desacetilación método FTIR.

Se preparó películas de quitosano al 0.1 %, mediante el siguiente procedimiento: se disolvió quitosano en ácido acético al 1 %. Se secó a 60 °C por 24 h, se lavó de 3 - 4 veces con una solución de amoníaco al 8 % en metanol y finalmente se lavó con metanol. Estas películas se secaron a 60 °C por 20 minutos y luego se almacenó en un desecador por 24 horas más, luego se hizo las medidas por FTIR.

Diagrama de bloques.



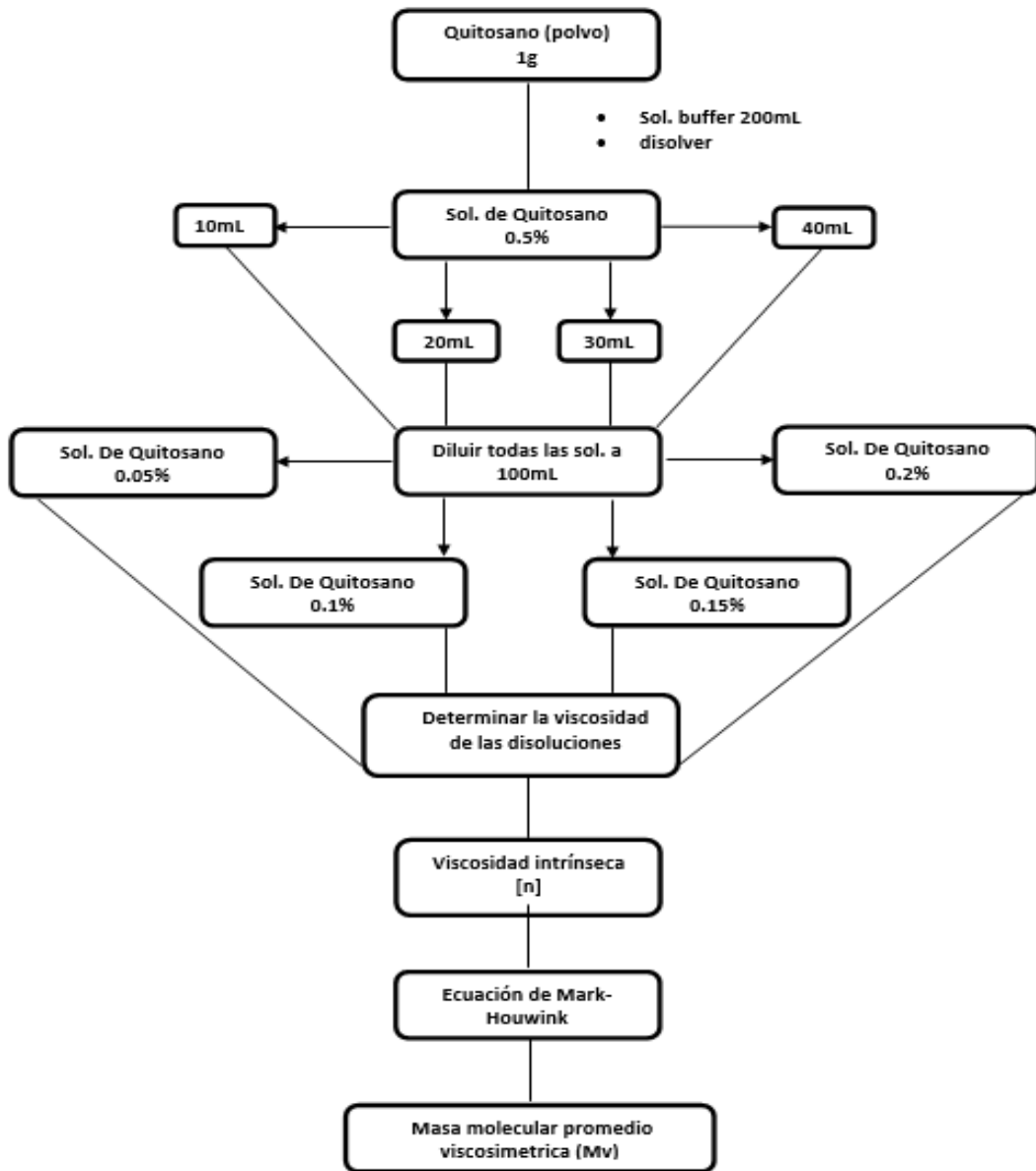
3.2.1.3. Determinación de la masa molecular promedio viscosimétrica (M_v) del quitosano:

Se preparó una solución buffer de CH_3COONa 0.1 M en CH_3COOH 0.2 M, que se utilizó como disolvente, para preparar las diferentes concentraciones de quitosano: 0.5%, 0.05 %, 0.1 %, 0.15 % y 0.2 % (w/v).

Se midió la viscosidad de las disoluciones de quitosano. Estas mediciones se realizaron en un baño a temperatura constante $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$, por quintuplicado, esta medida de viscosidad también se realizó para el buffer.

Se determinó la viscosidad intrínseca $[\eta]$ mediante la ecuación de Huggins [51]. Seguidamente, con el dato del grado de desacetilación se determinó la masa molecular promedio viscosimétrica, a partir de las ecuaciones de Mark – Houwink para el quitosano.

Diagrama de bloques:



3.2.1.4. Espectroscopia FTIR

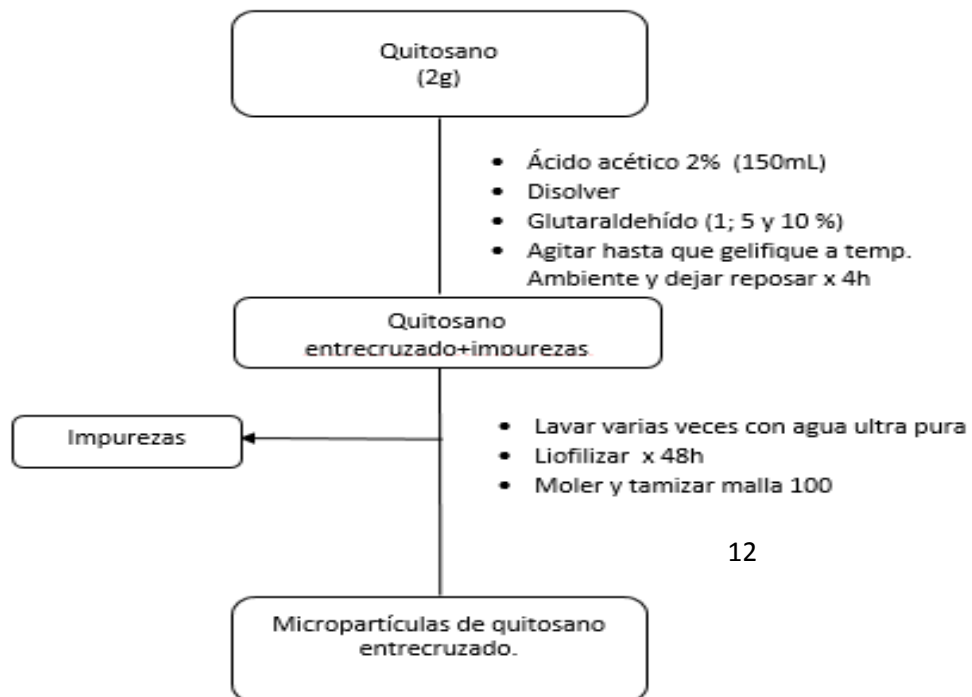
Las muestras de quitosano se trabajaron en polvo y tamizadas (malla Nº 100). Los espectros del quitosano se obtuvieron mediante espectroscopia infrarrojo (FTIR) por método ATR en la región de 650-4000 cm^{-1} .

3.2.2. ENTRECruzAMIENTO DE QUITOSANO (QE)

3.2.2.1. Preparación de quitosano entrecruzado con glutaraldehído

Disolver 2g de quitosano en 150mL de ácido acético al 2%, agregar las distintas proporciones de glutaraldehído (GL) dejar agitando por varias horas hasta obtener un gel dejar reposar 4 horas a más, luego lavar muchas veces con agua ultrapura para neutralizar y eliminar las impurezas, liofilizar, moler y tamizar (malla N°100).

Diagrama de bloques.



12

3.2.2.2. Caracterización de quitosano entrecruzado con glutaraldehído

i) Espectroscopia infrarroja. FTIR

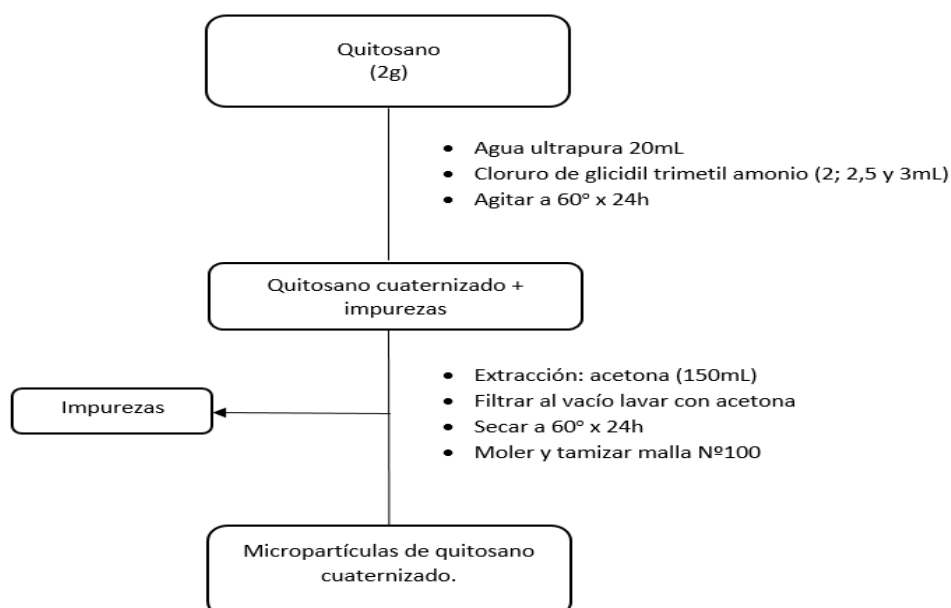
Las muestras de quitosano entrecruzado con glutaraldehído se trabajaron en polvo y tamizadas (malla N°100). Los espectros de quitosano entrecruzado se obtuvieron mediante espectroscopia infrarroja (FTIR) por método ATR en la región de 650-4000 cm^{-1} .

3.2.3. CUATERNIZACIÓN DE QUITOSANO (QC).

3.2.3.1. Preparación de micropartículas de quitosano cuaternizado.

Disolver 2 g de quitosano en 20mL de agua ultrapura, a esta mezcla se agregó 3mL de cloruro de glicidiltrimetilamonio (CTAG) bajo agitación a 60 °C por 24 h el producto de la reacción fue precipitado en 150mL de acetona, seguidamente filtrado al vacío y secado a 60 °C.

Diagrama de bloques.

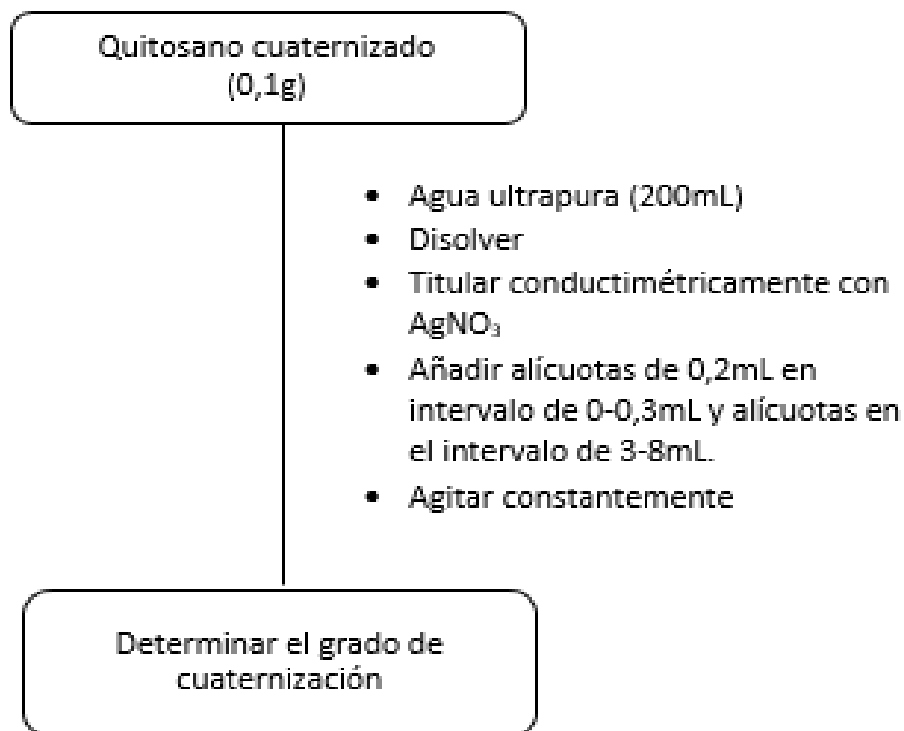


3.2.3.2. Caracterización de quitosano cuaternizado.

i) Determinación del grado de cuaternización.

Se disolvió 0.1g de QC en 200mL de agua ultrapura. Luego se tituló con una solución de AgNO_3 0.1 M por el método conductimétrico. En esta valoración se agregó alícuotas de 0.2mL en el intervalo de 0 a 3mL y alícuotas de 0.5mL en el intervalo de 3 a 8mL en constante agitación de la solución. Se anotó en cada adición la conductividad respectiva.

Diagrama de bloques.



ii) Espectroscopia infrarroja. FTIR.

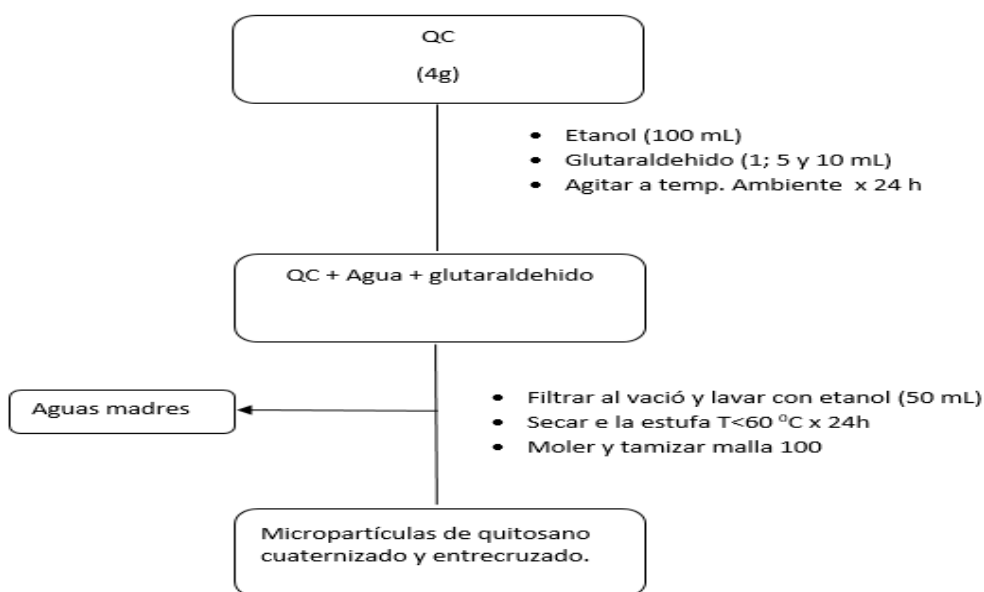
Las muestras de quitosano se trabajaron en polvo y tamizadas (malla N°100) por la técnica ATR. Los espectros del quitosano se obtuvieron mediante espectroscopia infrarrojo (FTIR) en la región de 650-4000 cm^{-1} .

3.2.4. ENTRECruzamiento DE QUITOSANO CUATERNIZADO (QCE)

3.2.4.1. Preparación de quitosano cuaternizado entrecruzado con glutaraldehído

Se añadió 4g de quitosano cuaternizado (QC) a una solución de 100mL de etanol y (1, 5 y 10mL) de glutaraldehído (50%, W/V), esta mezcla se mantuvo en agitación constante durante 24h a temperatura de ambiente, el material obtenido se filtró y se secó a una temperatura de 60 °C.

Diagrama de bloques.



3.2.4.2. Caracterización de quitosano cuaternizado entrecruzado con glutaraldehído

i) Espectroscopia infrarroja. FTIR

Las muestras de quitosano cuaternizado entrecruzado con glutaraldehído se trabajaron en polvo y tamizadas (malla N°100). Los espectros de quitosano cuaternizado se obtuvieron mediante espectroscopia infrarroja (FTIR) por la técnica ATR en la región de 650-4000 cm^{-1} .

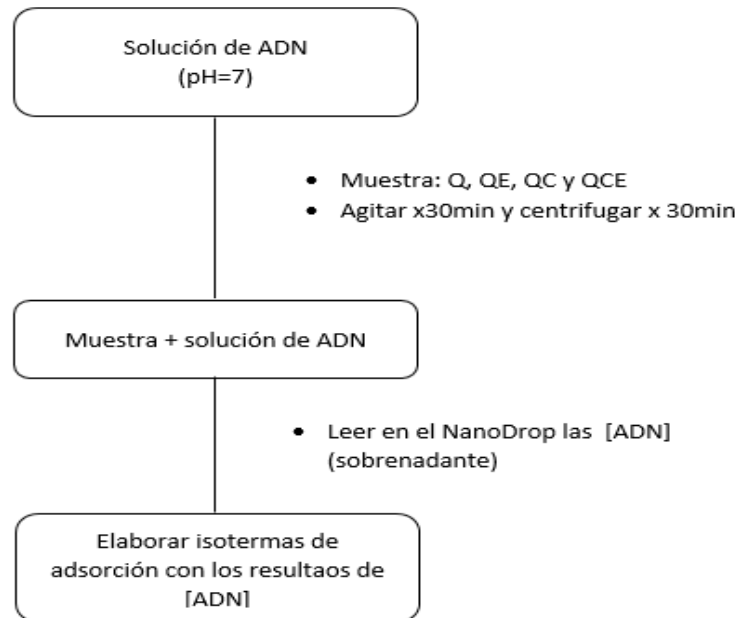
Nota: los análisis de DRX, TGA, DTG y SEM se hicieron en Brasil, Universidad de Sao Paulo /FFCLRP/Depto. de Química.

3.2.5 PROCESO DE ADSORCIÓN DE ADN

3.2.5.1 Preparación de las curvas de adsorción de ADN

Para la construcción de las isothermas de adsorción se partió de soluciones con diferentes [ADN]: 2, 5, 10, 20, 40, 80, 100, 200 y 400 ng/ μL . En todas las disoluciones, se trabajó a un pH ≈ 7 , se agregó cierta masa de micropartículas (Q, QE, QC y QCE) una vez transcurrido el tiempo de contacto (30min agitación y 30 min de centrifugación) se analizó la [ADN] de la fase líquida (sobrenadante) en un equipo NanoDrop.

Diagrama de bloques.



Capítulo 4

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Para los distintos análisis de caracterización se trabajaron con muestras liofilizadas y tamizadas (malla N°100). Los espectros de FT-IR se determinaron de manera directa en un equipo IRPrestige-21 (Shimadzu), las muestras se sometieron a un barrido IR en el intervalo de 4000 cm^{-1} a 640 cm^{-1} por método ATR. El análisis termo gravimétrico (TGA) se llevó a cabo mediante el uso de DTG-60 analizador de la serie H (Shimadzu). Se colocó cerca de 8-10 mg por muestra en el analizador y el análisis fue programado de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un aumento de la temperatura de $10\text{ }^{\circ}\text{C x min}^{-1}$. La difracción de rayos X (XRD) de los tipos las micropartículas quitosano modificado se llevó a cabo en un equipo Bruker AXS D8 difractor con $\text{Cu K } \alpha$ ($1,54\text{ \AA}$) de radiación. Los patrones de difracción se registraron en la región de 2θ de 5 ° a 50 ° . Las lecturas de concentración de ADN se hicieron en un equipo NanoDropp 2000 (Thermo Scientific). la microscopía electrónica de barrido (SEM) se hizo en un equipo

4.1 Quitosano de partida

i) Espectroscopia FTIR

Se analizó por FTIR el quitosano de partida, se obtuvo los grupos funcionales característicos conocidos (Grafico N° 1), el resumen de estos se muestran en la tabla N°2.

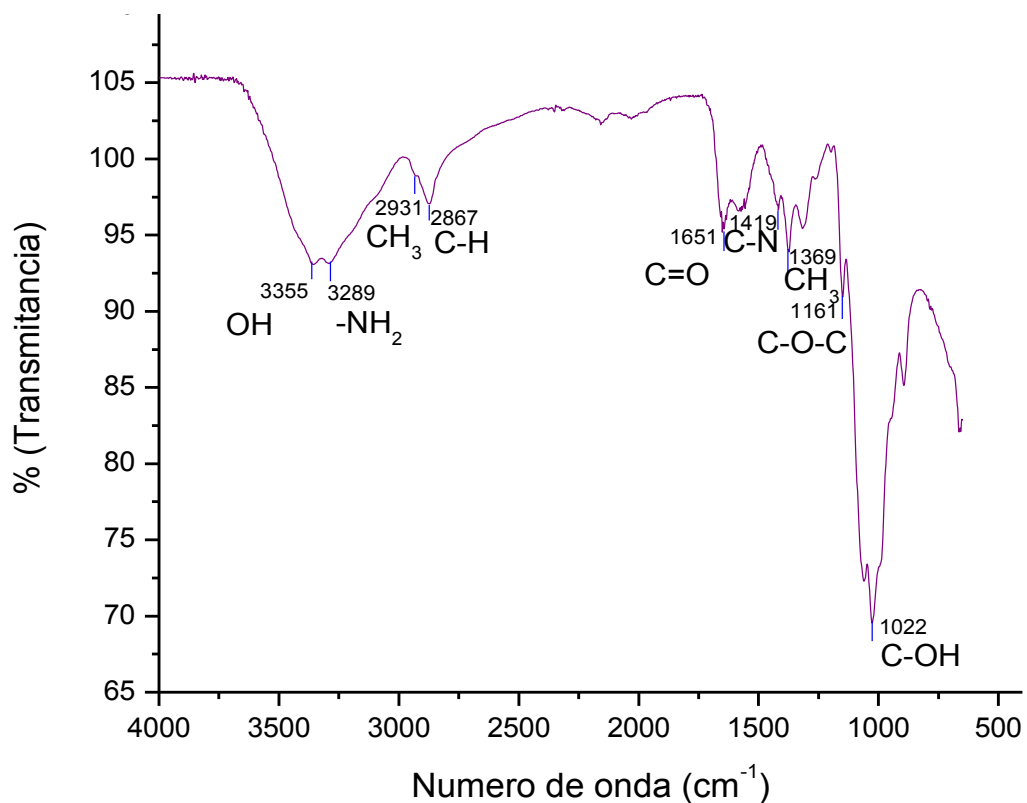


Grafico N°1: Espectro FTIR de los picos característicos de quitosano.

N°	Numero de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional característico quitosano
1	3355	-OH
2	3289	-NH₂ vibración de tensión
3	2931	-CH₃
4	2867	C-H de los grupos
5	1651	C=O estiramiento de los residuos N-acetil Amida I
6	1419	C-N estiramiento de residuos N-acetil amina iii
7	1369	-CH₃
8	1161	C-O-C
9	1022	C-OH

Tabla N°2: FTIR de los grupos característicos de quitosano.

Los picos característicos observados en el espectro de quitosano fueron los siguientes a 3355 cm⁻¹ corresponde a grupos –OH, a 3289 cm⁻¹ corresponde a vibraciones de tensión de los grupos –NH₂ del polímero, a 2867.cm⁻¹ seda los estiramiento C-H, a 1651 cm⁻¹ corresponde al C=O estiramiento de residuos N-acetil, en 1576 cm⁻¹ se da las flexiones N-H de amina primaria, en 1377 cm⁻¹ corresponde al –CH₃ y deformación del C-CH₃, a 1320 cm⁻¹ seda los estiramientos C-N de los residuos N-acetil, amida terciaria, a 1022 y 1064 cm⁻¹ corresponde a las vibraciones del esqueleto propias de su estructura y por último a 892.cm⁻¹ la tensión C-H de los grupos anoméricos. [57-58].

4.2 Grado de desacetilación (GD).

Se determinó por dos métodos valoración potenciométrica y metodo FTIR. Los resultados obtenidos en ambos métodos fueron valores comparables.

i) Método potenciométrico.

Se realizó una titulación con hidróxido de sodio (0.0990M), controlando el pH, de una cantidad de quitosano disuelta en HCl y se obtuvo los puntos de equivalencia que se muestran en el gráfico N°2 (línea azul).

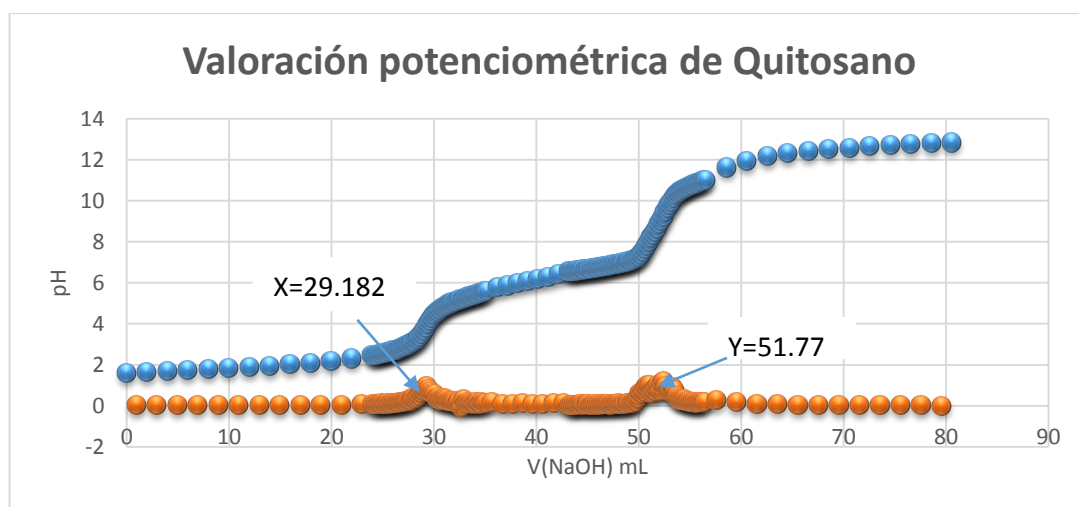


Grafico N°2: valoración potenciométrica del quitosano con NaOH 0.0990M (línea azul) y el método de la primera derivada (línea roja).

Los puntos equivalentes X y Y, que se obtuvieron de la primera derivada gráfico N°2 (línea roja), se evaluaron en la ecuación (20). [59-60]

$$GD = \% NH_2 = 16.1 \times \frac{(y-x)}{w} \times f \dots\dots(20)$$

Donde:

y: volumen equivalente mayor (mL)

x: volumen equivalente menor (mL)

f: concentración del NaOH (mol/L)

w: masa de la muestra de quitosano (g).

16.1 es un valor relacionado con el peso equivalente del quitosano.

De la ecuación (20) se obtuvo el GD de quitosano, que en promedio fue de **71.64 %**.

ii) Método por espectroscopia FTIR

Se determinó el GD de quitosano por el método FTIR, una vez obtenido el espectro infrarrojo de la película de quitosano, se tomaron en cuenta las bandas a 1655 cm^{-1} y 3450 cm^{-1} para el cálculo, estas se reemplazan en la ecuación de (Domszy – Roberts y Baxter) (21) [61], para obtener el GD de la siguiente manera.

$$GD = 100 - [(A_{1655} / A_{3450})] \times 100 / 1.33 \dots\dots(21)$$

Se trazó las líneas bases a las absorbancias A_{3454} y A_{1655} (gráfico N° 3)

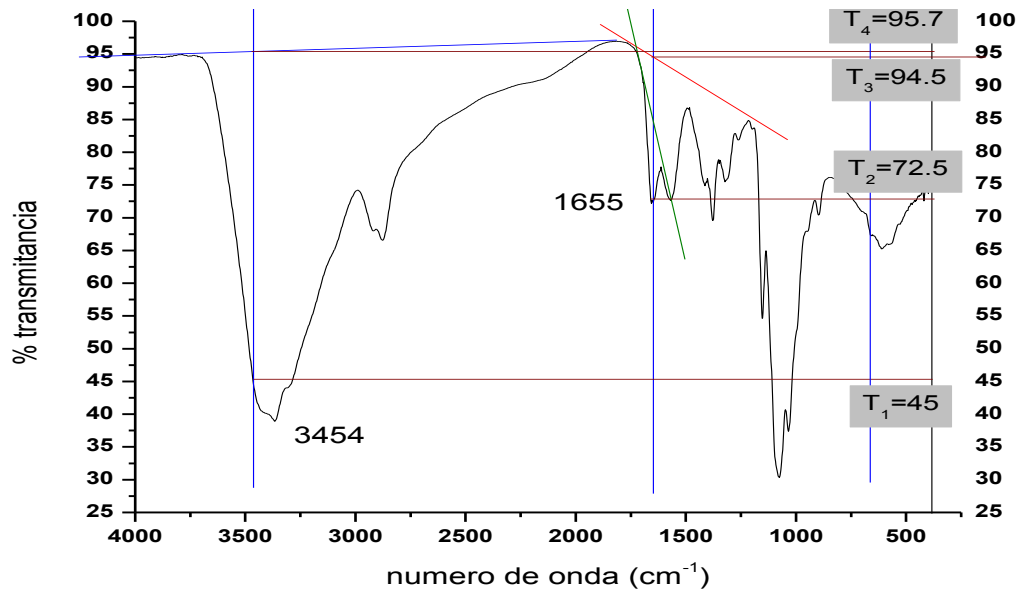


Grafico N° 3: Espectro FTIR de película Quitosano para el cálculo del GD.

Del gráfico N° 3 Se obtiene las transmitancias (T_1 , T_2 , T_3 y T_4), calculando las absorbancias (A_{3454} y A_{1655}) a partir de estos valores tenemos:

$$A_{3454} = -\text{Log} \left(\frac{T_1}{T_4} \right) = -\text{Log} \left(\frac{45}{95.7} \right) = 0.3277$$

$$A_{1655} = -\text{Log} \left(\frac{T_2}{T_3} \right) = -\text{Log} \left(\frac{72.5}{94.5} \right) = 0.1152$$

Reemplazando estos valores en la ecuación (21)

$$GD = 100 - [(A_{1655}/A_{3450}) \times 100 / 1.33] = 73.57\%$$

Como se observa, la diferencia de resultados en el GD obtenidos por los dos métodos anteriores, son aproximados (**71.64%** y **73.57%**), con lo que podríamos

concluir que el valor más exacto del GD se encuentra entre el rango de resultados, es así que se trabajó con el promedio de estos valores (**72.60%**).

El valor del GD que se obtuvo, nos relaciona la alta solubilidad que tiene el quitosano en medio ácido, esto ocurre debido a la protonación de sus grupos aminos ($-\text{NH}_2$). [62-64], también el valor del GD (**72.60%**) obtenido, nos ayudara para el cálculo de la masa molecular viscosimétrico del quitosano. Un punto importante que se toma en cuenta en el cálculo de GD por el método FT-IR, es la adecuada elección de las líneas bases en el espectro IR y como también la variabilidad de la temperatura del medio para la medida de la viscosidad de las distintas soluciones.

Es importante entender que un quitosano con grado de desacetilación alto, nos da mayor solubilidad y nos evidencia que los posibles grupos de modificación NH_2 se encuentren en mayor porcentaje, esto es importante en la modificación química, pues así se puede obtener mejores resultados tanto en el entrecruzamiento como en la cuaternización, los cuales se emplearán en la adsorción de ADN.

4.3 Determinación de la masa molecular viscosimétrica de quitosano

La viscosimetría es una de las técnicas más utilizadas y mide la viscosidad intrínseca $[\eta]$, que está relacionada con la masa molecular en la ecuación de Mark-Houwink [65].

$$[\eta] = KxM_v^\alpha \dots\dots (22)$$

De donde:

$[\eta]$: viscosidad intrínseca

K, α : constantes polímero-disolvente

M_v : Masa molecular promedio

Se determinaron los tiempos de caída de las diferentes soluciones de quitosano en el viscosímetro de Ostwald (Figura N°24) a una determinada temperatura (T=30 °C), los valores se muestran en la tabla N° 3, luego se procedió a realizar los cálculos de los distintos parámetros viscosimétricos (tabla N° 4). [65]



Figura N°24. Imagen de Viscosímetro de Ostwald utilizado para cálculo de los tiempos de caída de las distintas soluciones de quitosano.

Ensayo	[C] (g/ml)	t(s)
1	0	14,34
2	0,0005	14,52
3	0,001	17,82
4	0,0015	20,71
5	0,002	25,22

Tabla N° 3: Valores de tiempos de caída de las distintas soluciones de quitosano en el viscosímetro de Ostwald a 30°C.

Expresiones de viscosidad	Forma de calculo
Intrínseca	$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} [\eta]_{Red}$
Reducida	$[\eta]_{Red} = \frac{[\eta]_{sp}}{c}$
Especifica	$[\eta]_{sp} = [\eta]_{Rel} + 1$
Relativa	$[\eta]_{Rel} = \frac{n}{n_o} = \frac{t}{t_o}$

Tabla N° 4. Viscosidades que se consideran en el cálculo de la viscosidad intrínseca.

Ensayo	[C] (g/ml)	$[\eta]_{Rel}$	$[\eta]_{Sp}$	$[\eta]_{Red}$
1	0
2	0,0005	1,030	0,030	25,945
3	0,001	1,243	0,243	242,572
4	0,0015	1,444	0,444	296,276
5	0,002	1,759	0,759	379,481

Tabla N° 5: Determinación de las diferentes viscosidades para las distintas concentraciones de quitosano a 30° C.

La viscosidad intrínseca es: $[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} [\eta]_{Red}$

Representación gráfica: $[\eta]_{Red} = f_{(0)}$

$$Y = [\eta]_{Red} \quad ; \quad X = [c]$$

$$\text{Ajuste: } [\eta]_{Red} = f_{(0)} \Rightarrow [\eta] = f_{(0)}$$

Se graficó [c] vs $[\eta]_{Red}$ y se determinó $[\eta]$ (Grafico N°4)

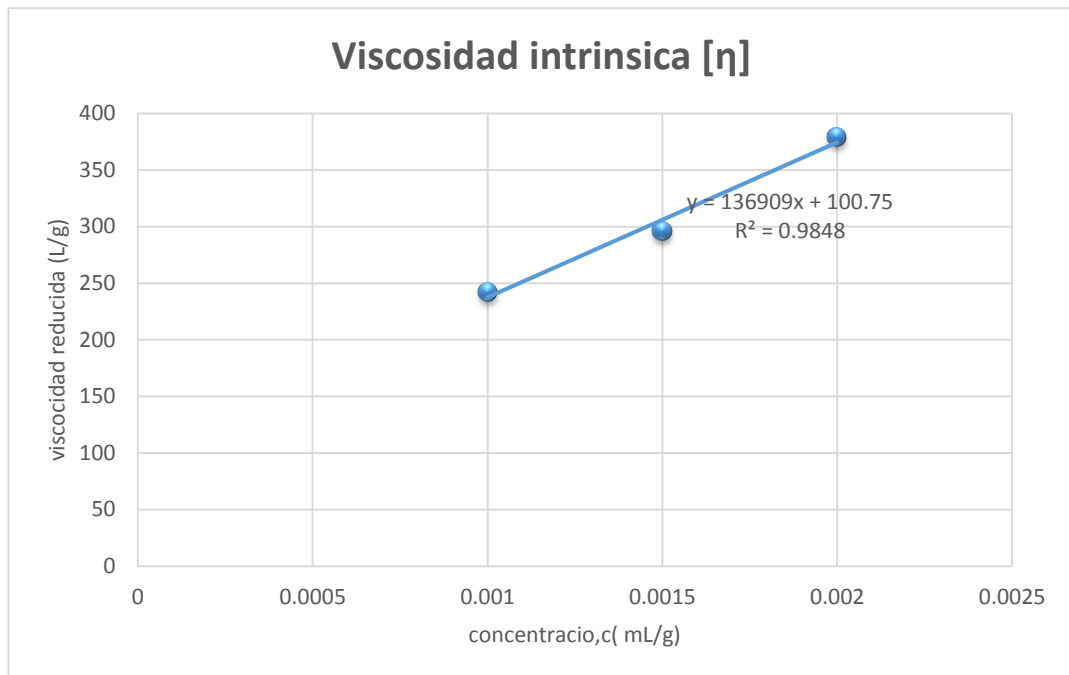


Gráfico N° 4: Determinación de la viscosidad intrínseca $[\eta]$

$$\text{Ajuste: } [\eta]_{Red} = 136909c + 100,75$$

$$[\eta] = \frac{Lim}{c \rightarrow 0} [\eta]_{Red} = f_{(0)} \Rightarrow [\eta] = 100,75$$

Para los cálculos de las constantes polímero-disolvente (\mathbf{k} y $\mathbf{\alpha}$) se toma las ecuaciones siguientes:

$$\alpha = -0.0102GD + 1.8159 \dots \dots \dots (23)$$

$$k \left(\frac{10^6 L}{g} \right) = \frac{136909}{[\eta]^2} \dots \dots \dots (24)$$

Los valores de $\alpha = 1.08$ y $k = 13.4878$, se calcularon a partir de GD y la viscosidad intrínseca $[\eta]$ respectivamente, reemplazando los valores de $[\eta]$, α y k en la ecuación Mark-Houwink (22)

$$[\eta] = KM_v^\alpha$$

Reemplazando los valores se obtiene el peso molecular viscosimétrico (M_v):

$$M_v = \frac{100.75^{\frac{1}{1.088}}}{13.49}$$

$$M_v = 455 \text{ KDa}$$

La determinación de la masa molecular viscosimétrica promedio del quitosano fue de *455KDa*, esto muestra un valor aceptable para un polímero orgánico de mediana masa molecular, resultado importante a la hora de entrecruzar, pues obtendremos un polímero con mejor grado de hinchamiento donde exista la probabilidad que el ADN se adsorba en sus redes.

4.4 Entrecruzamiento de quitosano (QE)

El espectro FTIR de QE y quitosano se muestra en la Figura N°5. Al comparar los picos entre ellos observamos lo siguiente, que el -NH₂ y O-H vibración de estiramiento en 3439 cm⁻¹ se desplaza a 3282 cm⁻¹, el -CH₃ estiramiento simétrico a 2925 cm⁻¹ se desplaza a 2944 cm⁻¹, el C = O vibración de estiramiento en 1666 cm⁻¹ se desplaza a 1656 cm⁻¹, el C-N vibración de estiramiento en 1438 cm⁻¹ se desplaza a 1406 cm⁻¹, y la C-OH vibración de tensión a 1073 cm⁻¹ se desplaza a 1036 cm⁻¹. Además, el CH₃ vibración de flexión en 1367 cm⁻¹ y C-O-C vibración de flexión en

1153 cm^{-1} se observaron en FITR de quitosano, pero no en FITR de QE. En contraste, la banda a 1567 cm^{-1} (amida II) se encontró en FITR de QE, pero no en FITR de quitosano. [66]

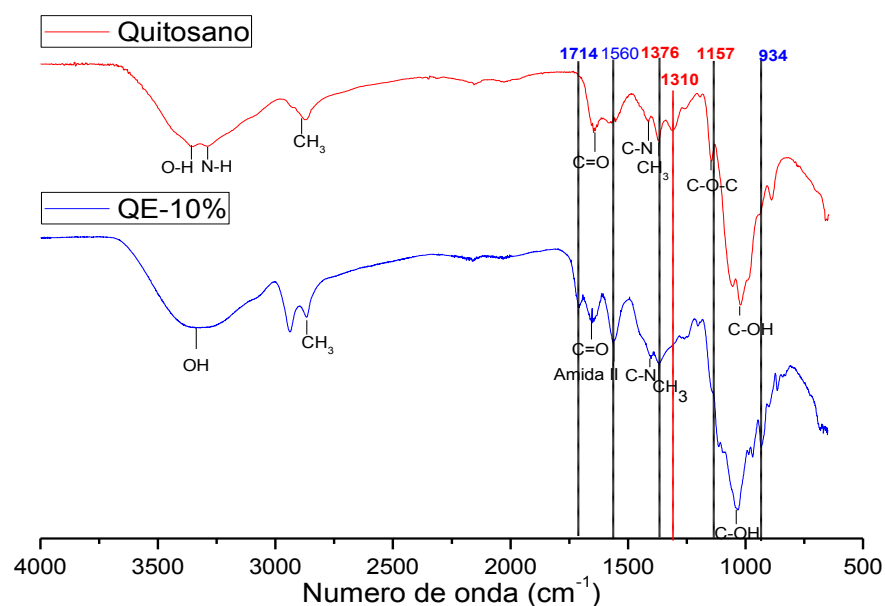


Gráfico N° 5. Espectro FTIR comparativo de quitosano y QE.

El resultado obtenido es consistente con muchos estudios anteriores [67-69], que han demostrado la diferencia en el perfil FITR del quitosano y QE. Los picos de quitosano 1310 cm^{-1} y 1157 cm^{-1} desaparecidos, nos pueden indicar haber sido limitados por el glutaraldehído que retícula al quitosano, de igual forma la aparición del pico en 1560 cm^{-1} (más intenso) gráfico N°6 y 934 cm^{-1} puede ser también atribuida a la reacción anterior. De hecho, Ramachandran et al. [70] encontró que el

nuevo pico agudo a 1610 cm^{-1} representa vibraciones de tensión de C-N en la base de Schiff formada por la reacción de glutaraldehído y quitosano. Además, Knaul. Et al [71] encontró que la película de quitosano que reaccionaron con glutaraldehído presenta una fuerte absorbancia a 1664 cm^{-1} , mientras que Gupta y Jabrail [72] informaron de que los espectros FTIR han mostrado una fuerte banda de absorción a 1660 cm^{-1} en microesferas de quitosano reticulado con glutaraldehído. Además, Oyrton et al [73]. Reveló que el aumento de glutaraldehído en la secuencia de los quitosanos modificados causó un aumento sucesivo de la intensidad de la frecuencia del enlace etilénico en 1562 cm^{-1} , esto último lo podemos observar en el grafico N°6.

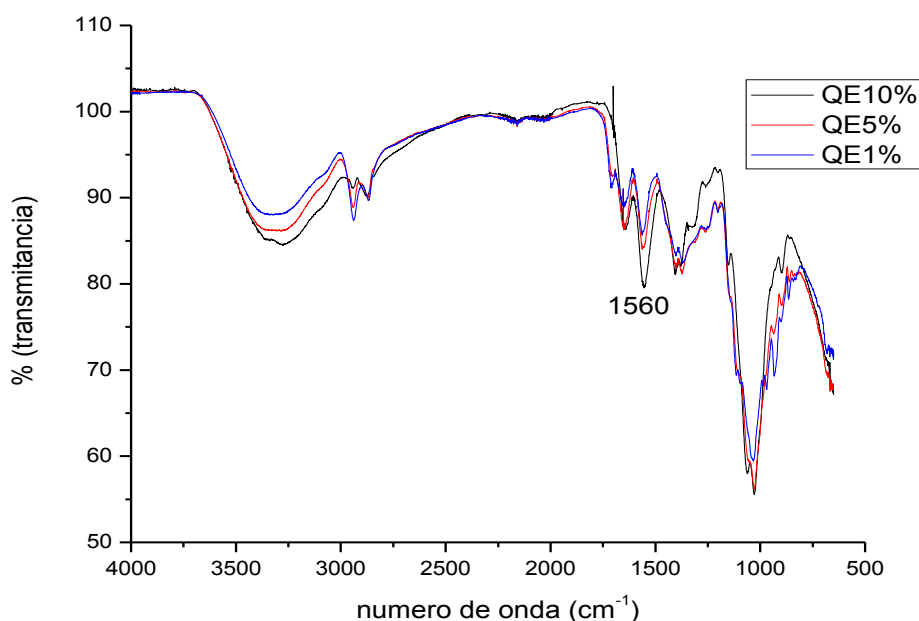


Gráfico N° 6. FTIR de QE con distintas proporciones de GTA (1%, 5% y 10%)

El resultado de este estudio indicó que la banda de amida II en 1560 cm^{-1} puede contribuir a la posibilidad que se está dando el entrecruzamiento del grupo amina del

quitosano con el glutaraldehído y también un aumento sucesivo de glutaraldehído (1%, 5% y 10%) es evidenciado por el aumento de intensidad de la banda en mención (aumento del grado de entrecruzamiento) Gráfico N° 6.

N°	Numero de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional
1	3282	-OH
2	2944	CH ₃ de los grupos
3	1655	C=O
4	1580	Amina II
5	1406	C-N
6	1378	CH ₃
7	1036	C-OH

Tabla N° 6. Grupos característicos quitosano entrecruzado.

4.5 Cuaternización de quitosano (QC).

Los espectros FTIR de QC con distinto proporción de CTAG (2; 2,5 y 3 mL) se muestra en el grafico N°7, se trabajaron con muestras en polvo y tamizadas (malla N°100).

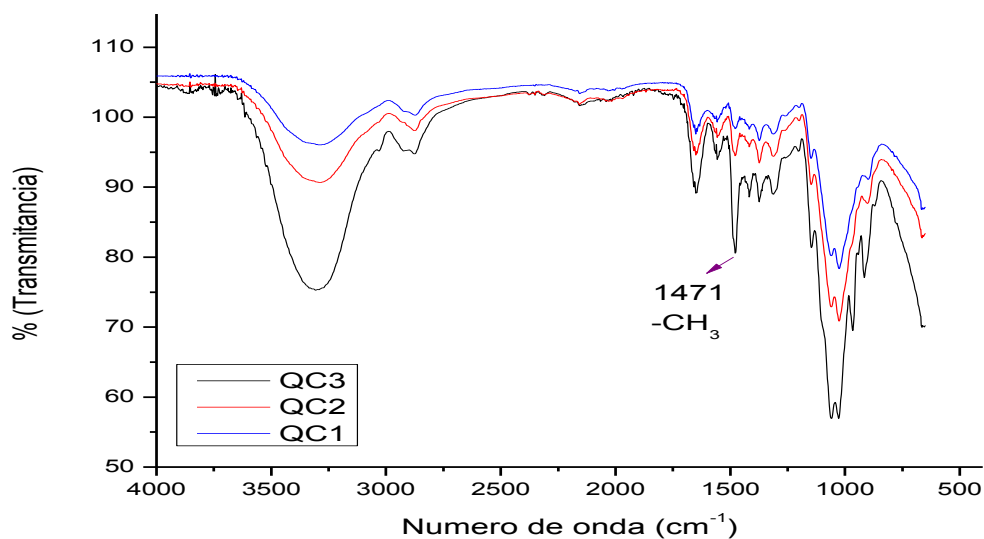


Grafico N°7. Espectros FTIR de QC con distinta proporción de CTAG.

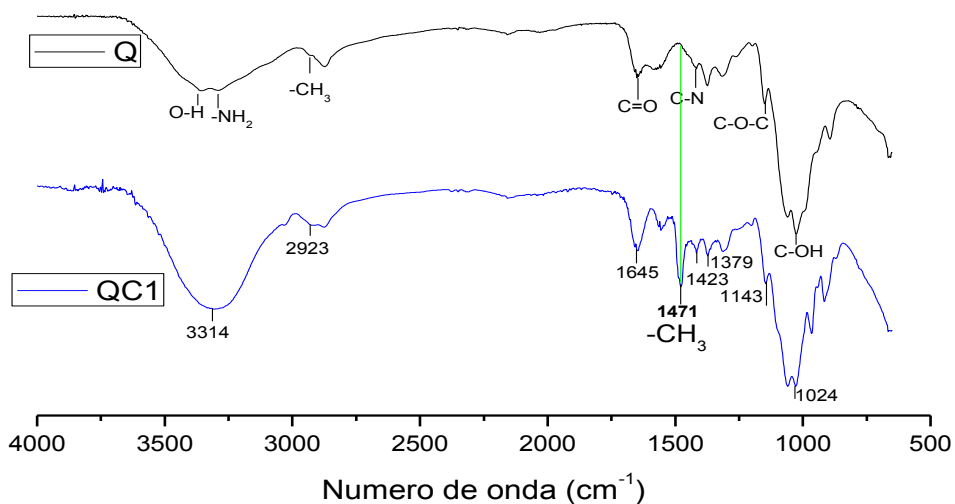
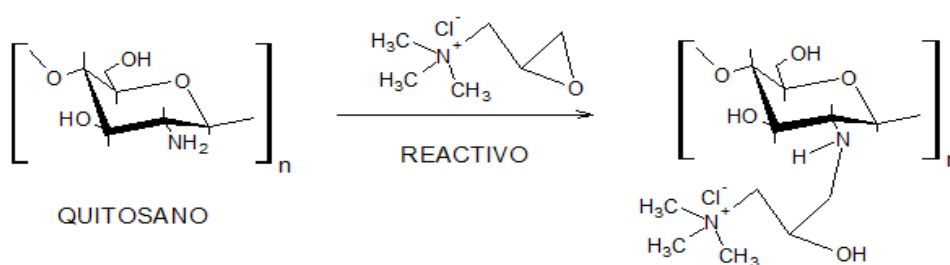


Grafico N°8: espectros FTIR de comparación Qitosano y QC.

Los espectros FTIR de QC con distinta proporción de CTAG se muestran en el gráfico N°7, se evidencia un nuevo pico intenso a 1471 cm^{-1} , probablemente debido a los grupos metilo del amino cuaternario formado por la cuaternización del quitosano,

en el gráfico N°8 tenemos la comparación de los espectros FTIR de quitosano y QC. Se evidencian los grupos característicos de quitosano (curva negra) y también se puede observar el pico distinto del QC (curva azul) en 1471cm^{-1} . Estos resultados son consistentes con estudios anteriores [74-76]. La formación del grupo amino cuaternario se da según la siguiente reacción química:



La formación del producto QC, se da por el ataque nucleofílico del grupo amino ($-\text{NH}_2$) del quitosano al epóxido del cuaternizante (CTAG), donde este último sufre ruptura formando la estructura final del QC.

Con la pérdida del grupo amino aparece un solo pico ancho debido a las tensiones $-\text{NH}_2$, O-H y a 1471 cm^{-1} aparece un pico bien marcado el cual corresponde al estiramiento asimétrico C-H, de los grupos metilos que son características del CTAG [77]. Los demás picos permanecen igual al espectro de quitosano de partida, debido a que no se modificó otras partes de la estructura del quitosano. Esto se puede apreciar en la superposición de espectros FTIR (gráfico N° 8).

N°	Numero de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional
1	3314	-OH
2	2923	-CH₃ de los grupos
3	1645	C=O
4	1471	-CH₃ (de los grupos aminos cuaternarios)
5	1423	C-N
6	1379	C-CH₃
7	1143	C-O-C
8	1024	C-OH

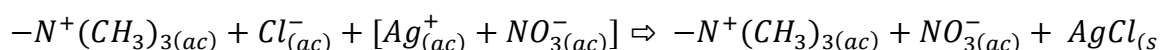
Tabla N° 7: grupos característicos de QC.

El FTIR de QC nos evidencia una posible cuaternización, también el aumento en el grado de cuaternización (2; 2,5 y 3mL de CTAG) se refleja en el aumento de la banda 1471cm⁻¹ como se muestra en el gráfico N° 7. Una mayor cuaternización de quitosano nos da una mayor probabilidad de adsorción (interacción electrostática) entre QC y el ADN.

i) Grado de cuaternización QC.

Se hizo una valoración conductimétrica de los tres tipos de QC: QC1 (2mL de CTAG), QC2 (2,5mL de CTAG) y QC3 (3mL de CTAG) con AgNO₃ 0.1 M, para la determinación de la cantidad de grupos de aminos cuaternarios formados.

El fenómeno que ocurre en la titulación conductimétrica es el siguiente. Antes de la titulación con AgNO_3 se tiene en la disolución pares iónicos de cloruro (Cl^-) interactuando con amonio cuaternario $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ (constante), esta última unida es parte del biopolímero. El agua se disocia muy poco, así que no se consideró en el análisis. Al ir añadiendo alícuotas de AgNO_3 la conductividad en la disolución disminuye porque se da la sustitución del ion Cl^- de mayor conductividad ($76,3 \text{ S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$) por el ion NO_3^- de menor conductividad ($71,4 \text{ S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$) [78]. Esto es evidenciado por la precipitación del AgCl como se muestra en la siguiente reacción:



La disminución de la conductividad se da hasta la interacción total de los iones Cl^- con los iones Ag^+ esto hasta el punto de equivalencia, luego la conductividad empieza a crecer, únicamente por el aumento de iones Ag^+ ($61,9 \text{ S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$) y NO_3^- ($71,4 \text{ S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$) en la disolución.

En el gráfico N°10, se muestra la titulación conductimétrica de tres tipos de QC (QC1, QC2 y QC3) para luego determinar la cantidad de grupos amonio cuaternario de manera indirecta, pues la cantidad de número de equivalentes de cada ion (Cl^- , $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) es el mismo. Entonces el grado de cuaternización será la cantidad de grupos cuaternizantes que se formaron.

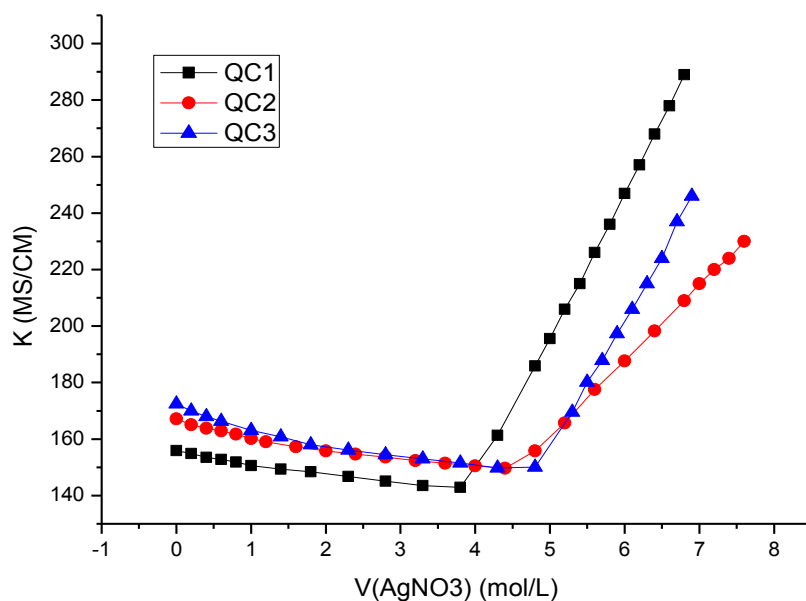


Grafico N°9. Titulación conductimétrica para determinar el grado de cuaternización de las distintos tipos QC

NOTA: Las titulaciones conductimétricas se realizaron por duplicado en los tres casos

Biopolímero	Pico diferencia (cm^{-1})	Grupos amino cuaternario (mg/g)
Quitosano	3300	Indeterminado
(QC1)	1471	228.57
(QC2)	1471	242.70
(QC3)	1471	268.44

Tabla N°8. Valores en miligramos de los grupos amino cuaternario por gramo de quitosano utilizado

La tabla N°8 nos muestra que el QC3 tiene mayor grado de cuaternización (268.44 mg/g) en consecuencia, esto nos evidencia que dicha micropartículas tendría una mayor probabilidad para la interacción con el ADN.

4.6 Entrecruzamiento de quitosano cuaternario (QCE).

El entrecruzamiento QC con GL se realizó con la finalidad de dar resistencia en medios ácidos. El FTIR de quitosano y QCE se muestra en el grafico N°10. La curva Q nos muestra los picos a 3289 cm^{-1} y 1161 cm^{-1} se atribuyen a la vibración de tensión de -OH y C-O-C, respectivamente, a 1651 cm^{-1} nos muestra C=O, que es causada por la vibración de tensión de carbono doble enlace. En comparación con la curva QCE nos muestra un nuevo pico intenso a 1476 cm^{-1} este aparece probablemente debido a los grupos metilo de los grupos del cuaternizante. También, la amina -NH a 3335 cm^{-1} de quitosano desaparece, lo que implica que hay una probabilidad que los -NH₂ de quitosano han reaccionado con los grupos epóxido de CTAG y los grupos aldehídos de GL. Estos resultados son consistentes con los espectros informados [79-81].

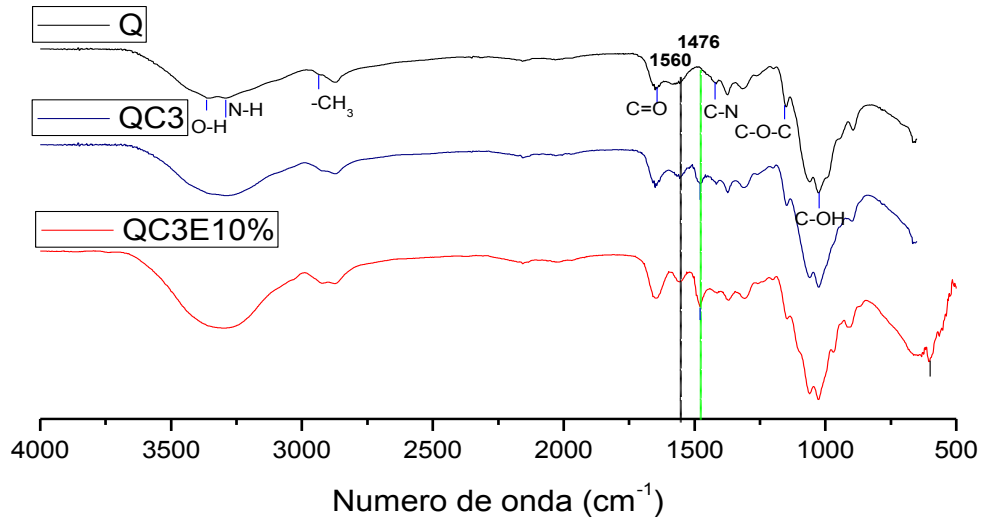


Gráfico N^o 10. FTIR de Qitosano, QC y QCE.

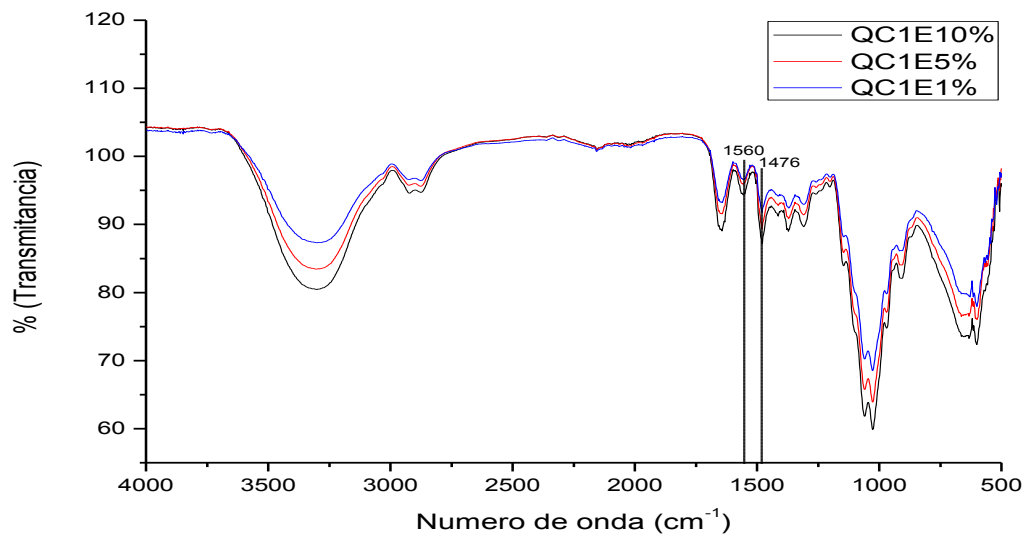


Gráfico N^o 11: FTIR de QC1E con distinto porcentaje de entrecruzamiento

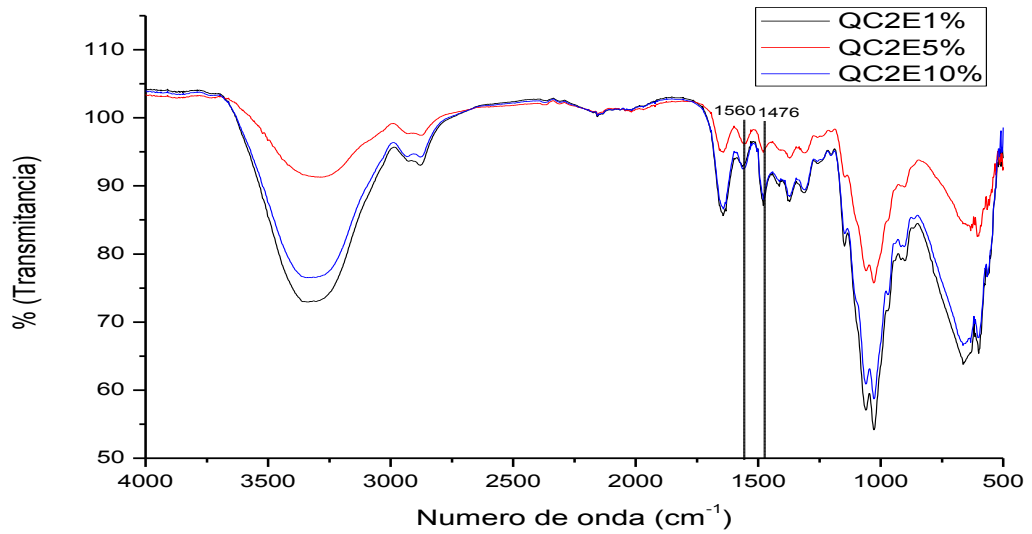


Gráfico N° 12: FTIR de QC2E con distinto porcentaje de entrecruzamiento

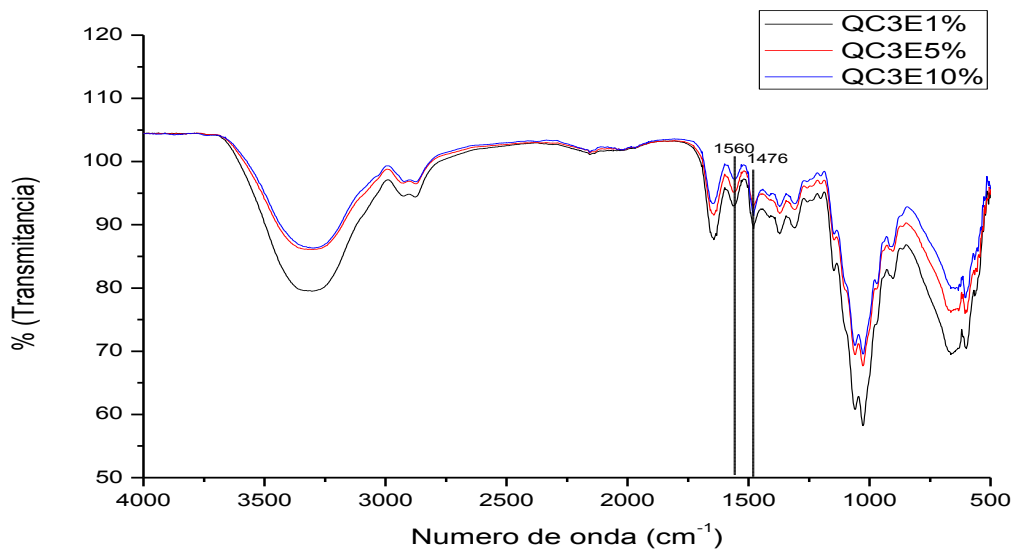


Gráfico N° 13: FTIR de QC3E con distinto porcentaje de entrecruzamiento

Se entrecruzo los tres tipos de QC (QC1, QC2 y QC3) con diferente proporción de GL (1, 5 y 10%). Se observa en los gráficos (Nº11, 12 y 13) la variación en las intensidades de los espectros, estos revelan que el incremento en GL causó un aumento sucesivo en la intensidad del enlace etilénico en 1560 cm^{-1} [78].

El QCE que se preparó fue un sólido granular de color crema (figura Nº25), debido al entrecruzamiento con GL se hace más estable en soluciones acuosas esto puede ser de mucha importancia en la adsorción de ADN.



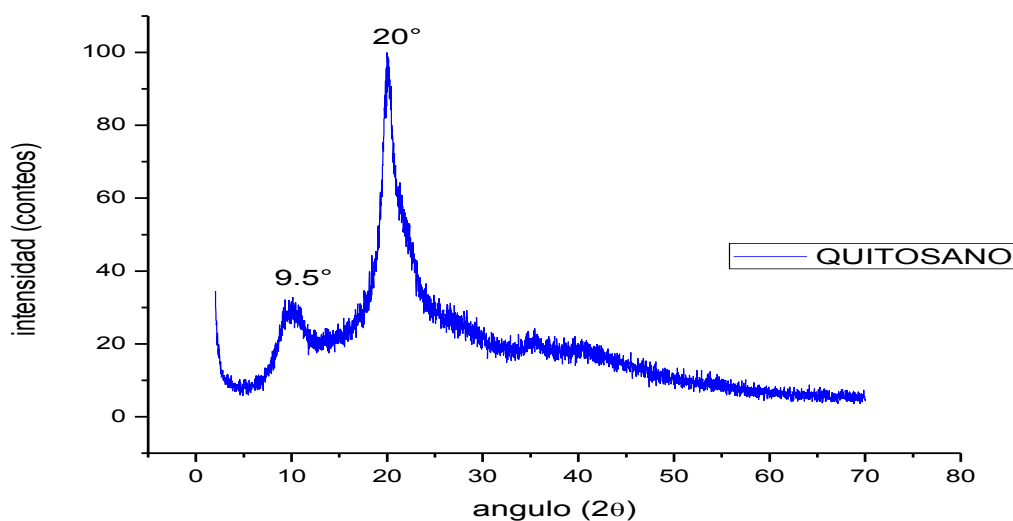
Figura Nº 23. Quitosano cuaternizado entrecruzado (QCE) obtenido.

4.7 Análisis por difracción de rayos x (DRX).

4.7.1 Difractograma de quitosano

El quitosano presenta dos formas cristalinas distintas debido a su polimorfismo, los patrones de difracción de rayos x presentan las diferentes mezclas de estas dos

formas. Los picos de difracción en el entorno de 9 a 10 y 19 a 20 (2θ) observadas en el grafico N° 14 están de acuerdo con otros resultados publicados. [82-84]



Grafica N° 14. DRX de quitosano

4.7.2 Difractograma de QE

La comparación de los patrones de difracción de rayos x entre QE y quitosano (Grafico N°15), pone en evidencia que los picos característicos de quitosano ($2\theta = 9,5^\circ$ y 20°) desaparecieron y un pico ancho centrado y muy intenso a $2\theta = 20$ apareció, esta diferencia entre los patrones se atribuye a la reacción de entrecruzamiento que se da entre el quitosano y el glutaraldehído. [32], [33], [39] El amorfismo del pico de QE es una evidencia que la cristalinidad del quitosano disminuye después de la reticulación con glutaraldehído, esto se atribuye a los fuertes enlaces de hidrógeno del grupo amino los cuales al ser sustituidos destruyen eficazmente la regularidad de la estructura del quitosano original, dando como resultado la formación de la estructura amorfa.

También en el gráfico N°16 podemos observar que al aumentar la proporción de glutaraldehído (1, 5 y 10%) evidenciamos que la intensidad y la anchura del pico están aumentando con lo cual el grado de amorfismo también aumenta.

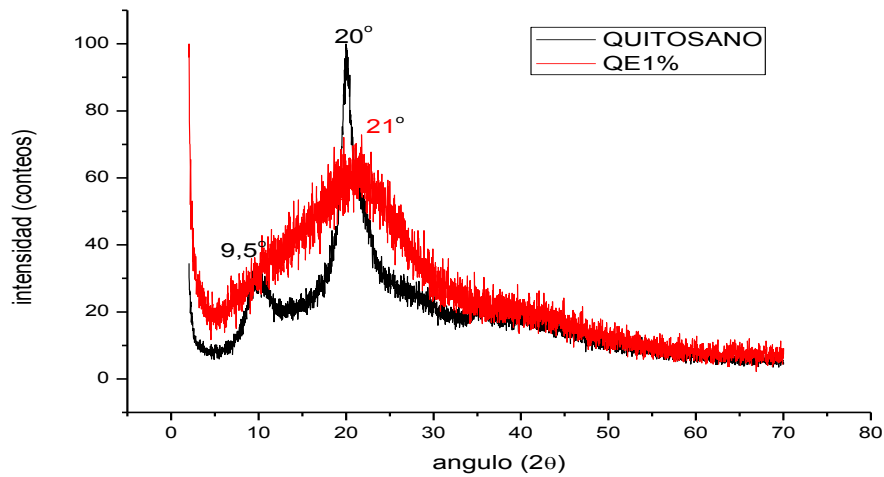


Gráfico N°15. Comparación de patrones de difracción de quitosano y QE.

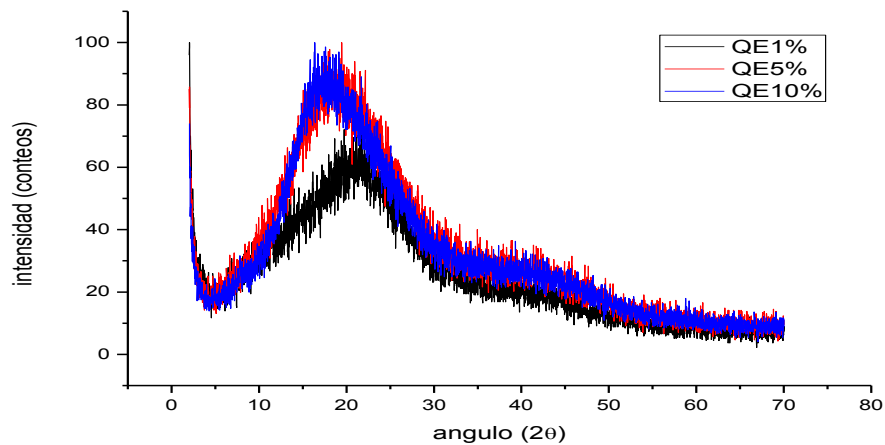


Gráfico N°16. Comparación de patrones de difracción de QE con diferentes porcentajes de glutaraldehído (1, 5, y 10%).

4.7.3 Difractograma de QC

El patrón de difracción de QC y quitosano (Grafico N° 17), nos muestra para el QC dos picos $2\theta = 5^\circ$ y 20° y para el quitosano se muestran sus dos picos característicos $2\theta = 9,5^\circ$ y 20° , se evidencia un ensanchamiento del pico $2\theta = 20^\circ$ y la desaparición del pico $2\theta = 9,5^\circ$, así como también la aparición de un nuevo pico $2\theta = 5^\circ$. En la comparación de ambos difractogramas, se observa que el grupo GTMAC al enlazarse con el grupo amino del quitosano hace que el pico original se ensanche esto es una posible evidencia que el grado de cristalinidad disminuye, haciendo la estructura más amorfa, también el nuevo pico $2\theta = 5^\circ$ que aparece puede ser una evidencia de la formación del grupo amino cuaternario del QC. El grafico N° 18 se observa diferentes patrones DRX de QC con distinta cantidad GTMAC (2, 2.5 y 3mL), podemos evidenciar que a mayor cantidad de cuaternizante la cristalinidad disminuye obteniendo un amorfismo mayor. [48]

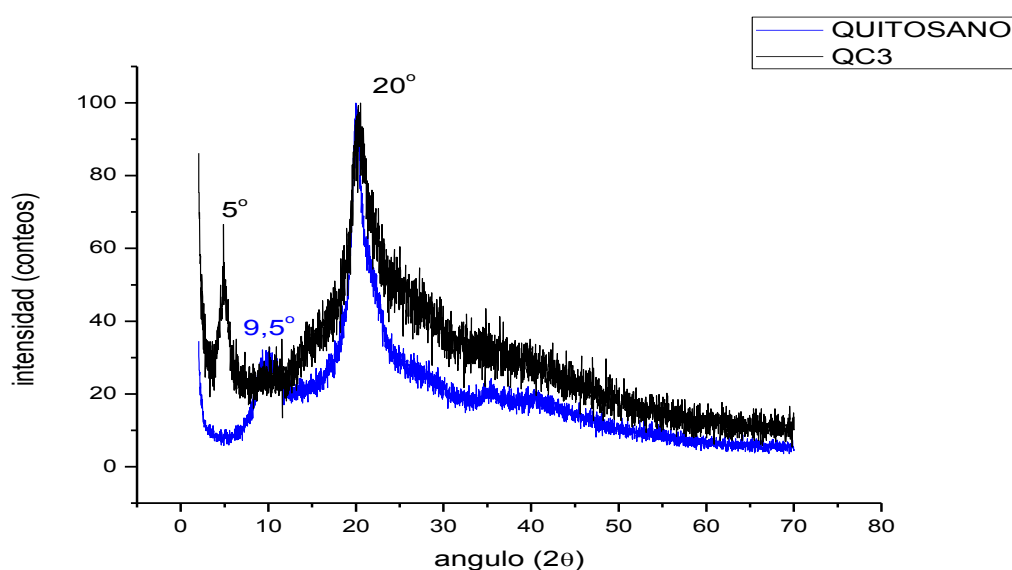


Grafico N°17. Comparación de patrones de difracción quitosano y QC3

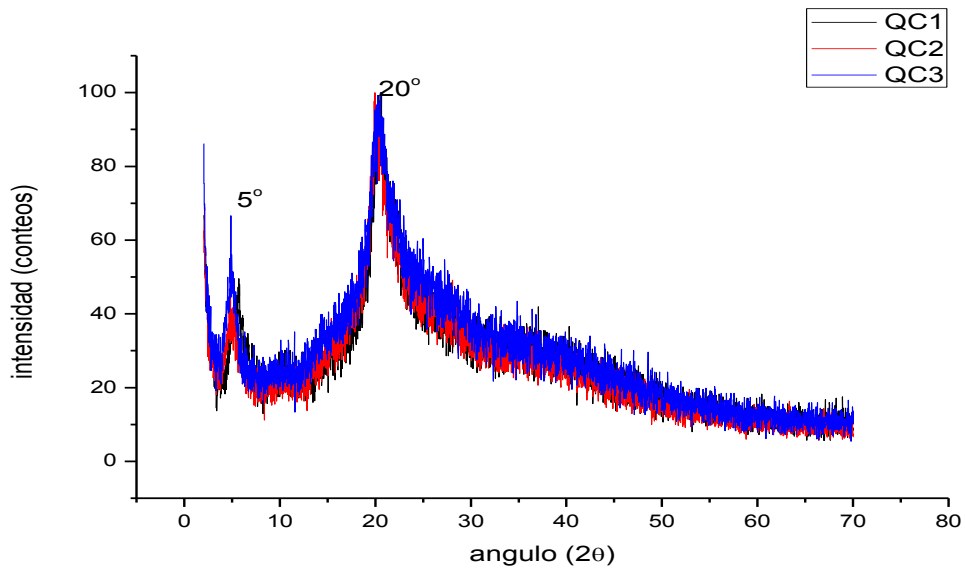


Grafico N°18. Comparación de patrones de difracción de QC con distinta cantidad de GTAMC (2, 2.5 y 3mL)

4.7.4 Difractograma de QCE

El los difractogramas de quitosano y QCE también se evidencia las mismas características observadas para quitosano y QC.

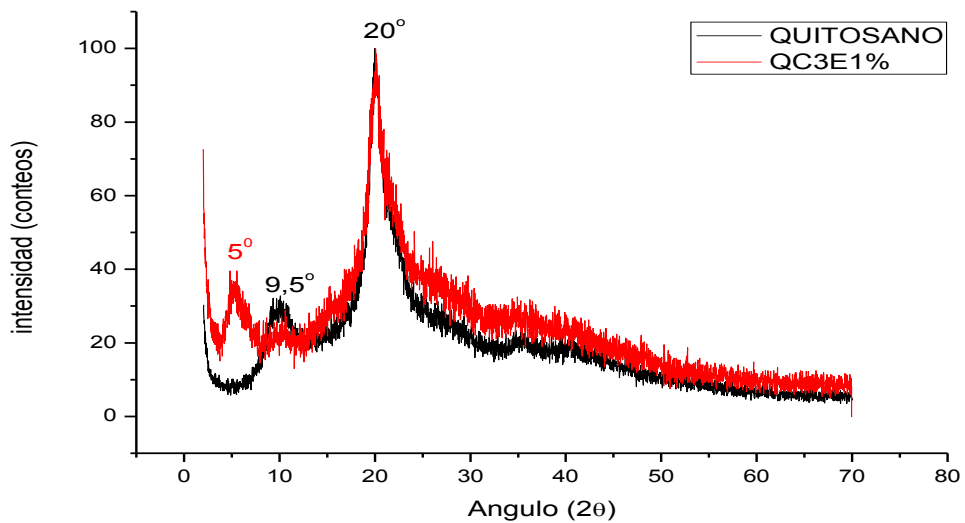


Grafico N°19. Patrones de DRX quitosano QCE

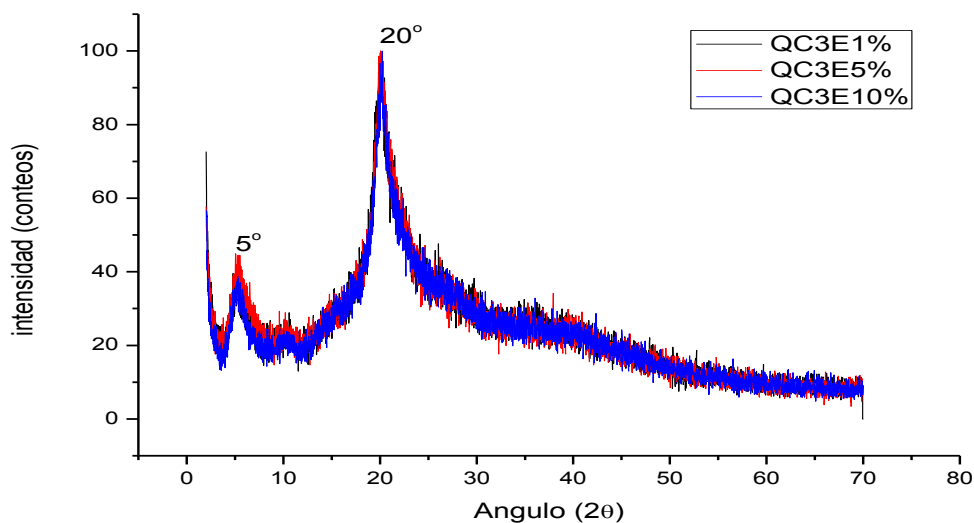


Grafico N°20. Patrones de DRX de QCE con distinta cantidad de GL (2, 2.5 y 3mL)

4.7.5 Determinación del índice de cristalinidad mediante técnicas de DRX.

Los patrones de difracción de los distintos tipos de quitosano modificado, al compararlos con los patrones establecidos por Guibal [85], nos muestran picos característicos. Calculamos el índice de cristalinidad para todos los tipos de quitosano usando el método propuesto por Fosher [86] y tomando en cuenta las intensidades en $2\theta = 20^\circ$, 12.7° , 11.9° y 11.6° en el difractograma (grafico N°20).

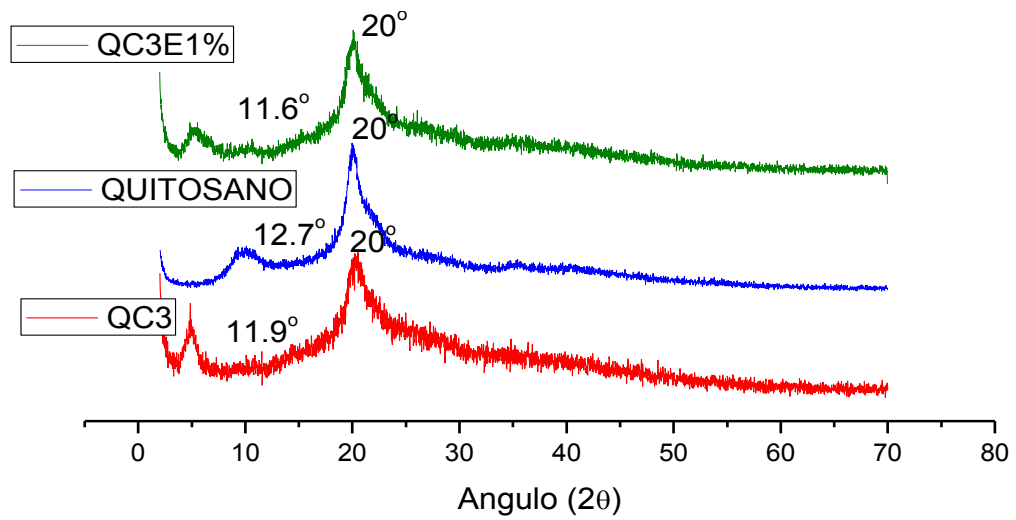


Grafico N°21 Comparación de patrones de difracción de los distintos tipos de quitosano modificado: quitosano, QC y QCE.

$$I_{crist} = \frac{(I_{max} - I_{min}) * 100}{I_{max}} \dots (25)$$

Donde:

I_{max} : es la máxima intensidad del pico cristalino máximo a $2\theta = 20^\circ$

I_{min} : es la mínima intensidad del pico cristalino.

Reemplazando los datos de la gráfica N°20 en la ecuación 25, determinamos el índice de cristalinidad de los tipos de quitosano modificado (tabla N°9).

MUESTRA	INDICE DE CRISTALINIDAD (%)
QUITOSANO	78.7
QCE	76.2
QC	74.1

Tabla N°9: resultados de índice de cristalinidad para los tipos de quitosano modificado.

La tabla N°9 nos muestra resultados de índices de cristalinidad según estudios anteriores [86], sugieren que una estructura altamente ordenada aumenta su capacidad de adsorción, a su vez se ve influenciado por la accesibilidad de las moléculas de agua [87].

4.8 Análisis termogravimétrico (TGA)

Los termogramas obtenidos en análisis TGA de los tipos de quitosano modificado, se muestran a continuación.

4.8.1 Termograma de quitosano

La curva calorimétrica del quitosano (Grafico N° 22) nos muestran tres eventos térmicos. El primer evento ocurre debido a la pérdida de humedad entre 60 y 110°C, esto es debido a la evaporación del agua, el segundo evento corresponde a la despolimerización en la que ocurre una máxima pérdida de masa entre 220 y 300 °C,

probablemente debido a la degradación de las cadenas principal del quitosano (ruptura de los enlaces C-O-C), además de la separación de grupos acetilo (Hassan et al, 2012). El tercer evento llamado pirolisis, el cual se da por la descomposición del material orgánico final.

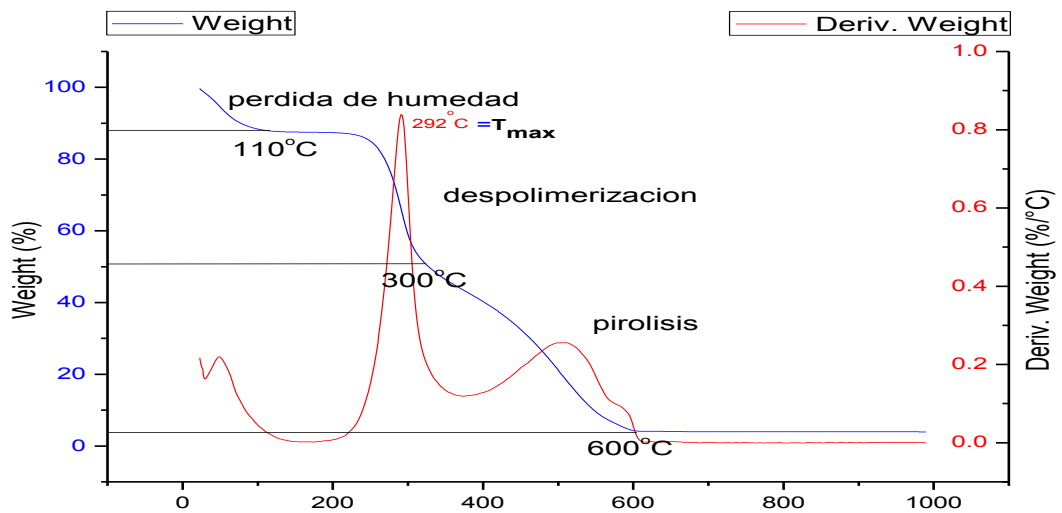


Gráfico N° 22. Análisis TGA y DTG de quitosano.

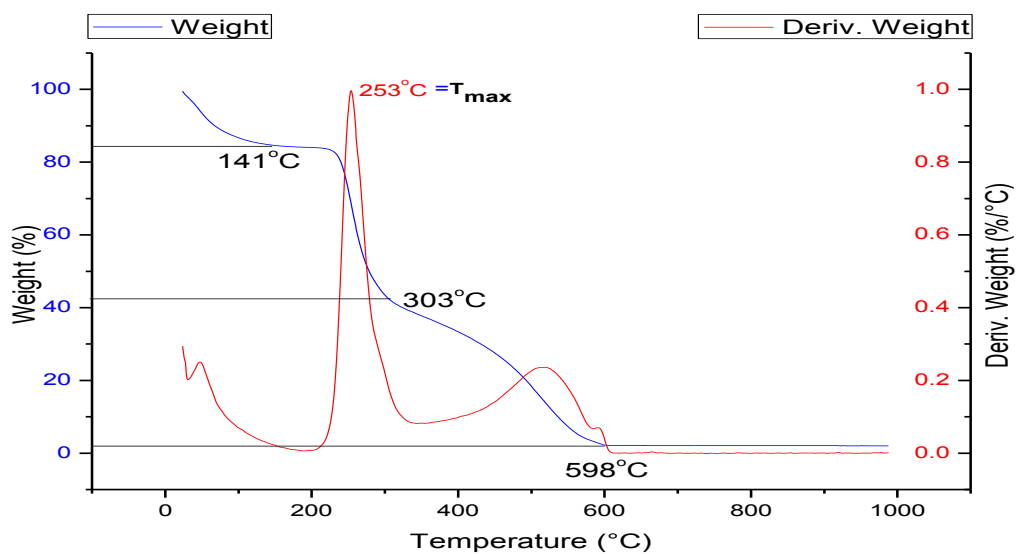


Gráfico N° 23. Análisis TGA y DTG de QC3

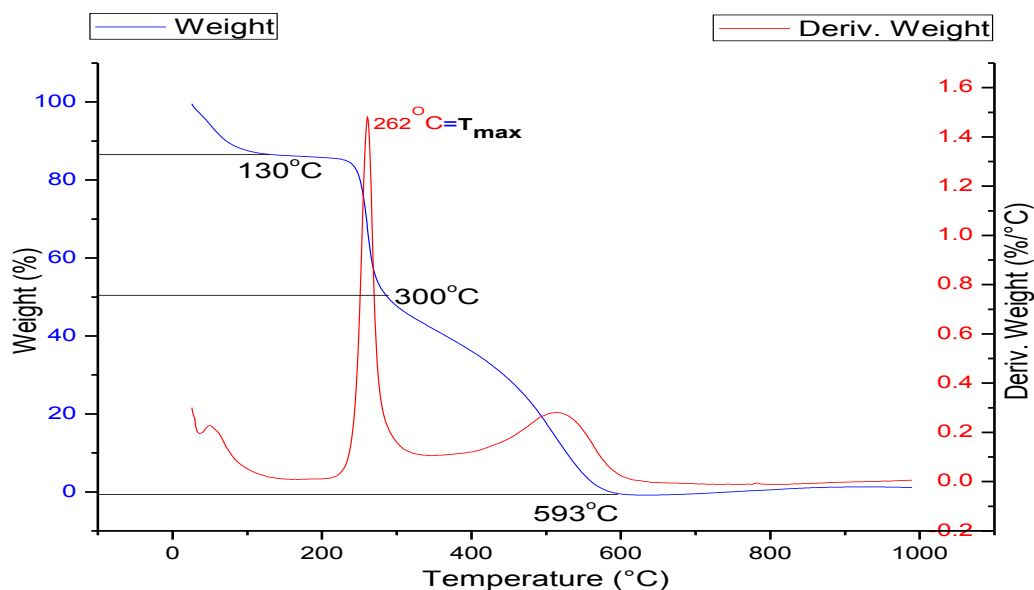


Gráfico N° 24. Análisis TGA y DTG de QC3E.

Los termogramas TGA y DTG de quitosano y QC3, QC3E (gráfico N° 22-24) nos muestran una diferencia en su temperatura de máxima velocidad de descomposición (T_{max}), que se da en el segundo evento y se pone en evidencia en las curvas DTG (línea roja, gráfico N° 22-24). Esta temperatura es mayor para el quitosano en comparación con el QC3 y QCE3 (292, 259 y 263°C), probablemente debido a que el quitosano presenta mayor índice de cristalinidad evidenciados en los difractogramas DRX y en los análisis calorimétricos. También podemos evidenciar que las curvas calorimétricas de quitosano, QC3 y QC3E tienen en común la manifestación de tres eventos térmicos, sin embargo es el segundo evento que muestra una diferencia en el valor de T_{max} , esto se debe considerar en estos cuatro polímeros.

La T_{max} para el quitosano es mayor en comparación con la del QC3 y QCE3, este comportamiento lo atribuimos al grado de cristalinidad. Esta diferencia de la cristalinidad se refleja en la estabilidad térmica, puesto que un polímero al poseer

mayor cristalinidad su estructura molecular será más rígida y por consiguiente se necesita mayor energía para que se pueda descomponer. La disminución en la temperatura de descomposición en QC3 y QCE3, se puede atribuir a la disminución en la estabilidad térmica como consecuencia de la interacción de los grupos amino del quitosano con el GTMAC y GL. Otra observación que se tiene entre el quitosano y el QE es una diferencia muy notoria en sus termogramas, específicamente el QE (gráfico N° 25) el cual se observa que es el menos estable térmicamente pues inicia con la pérdida de peso alrededor de los 130°C, dándose una descomposición multietapa en donde los productos intermedios no son nada estables, esto se puede atribuir al entrecruzamiento de los grupos amino del quitosano y el GL, también se evidencia la pobre cristalinidad del QE debido a la baja estabilidad, también observado en los difractogramas DRX. [88-90].

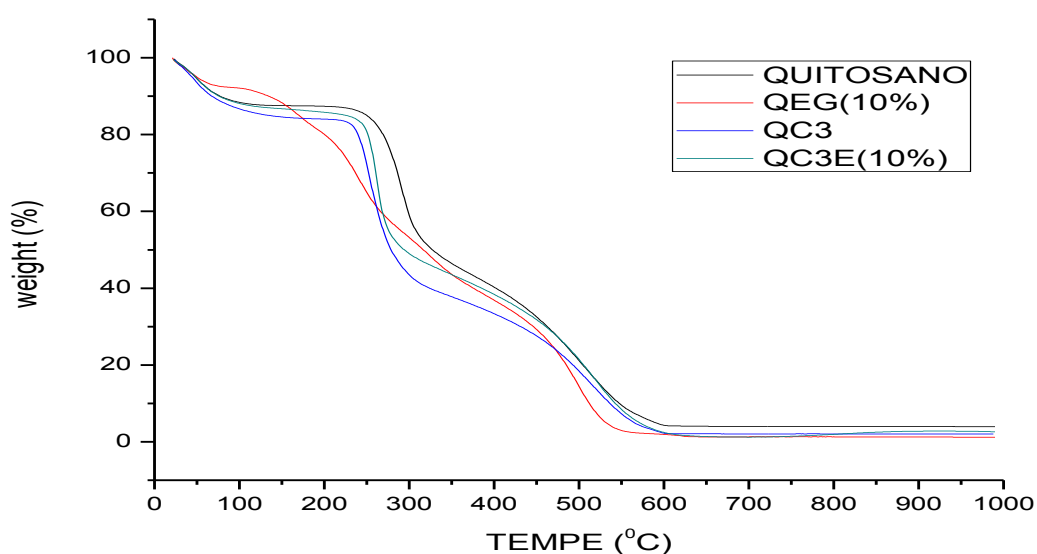


Gráfico N° 25. Análisis termogravimétrico realizados a las muestras de quitosano, QE, QC y QCE.

El análisis TGA y DTG nos muestra la importancia de la estabilidad de una estructura y de como esta se relaciona con su cristalinidad, esto es muy importante pues al adsorber ADN con los tipos de quitosano nos daremos cuenta la importancia de que un polímero sea más cristalino, pues un polímero que tenga una cristalinidad alta no significa que su superficie de adsorción va ser lisa u homogénea.

4.9 Microscopia de barrido superficial (SEM)

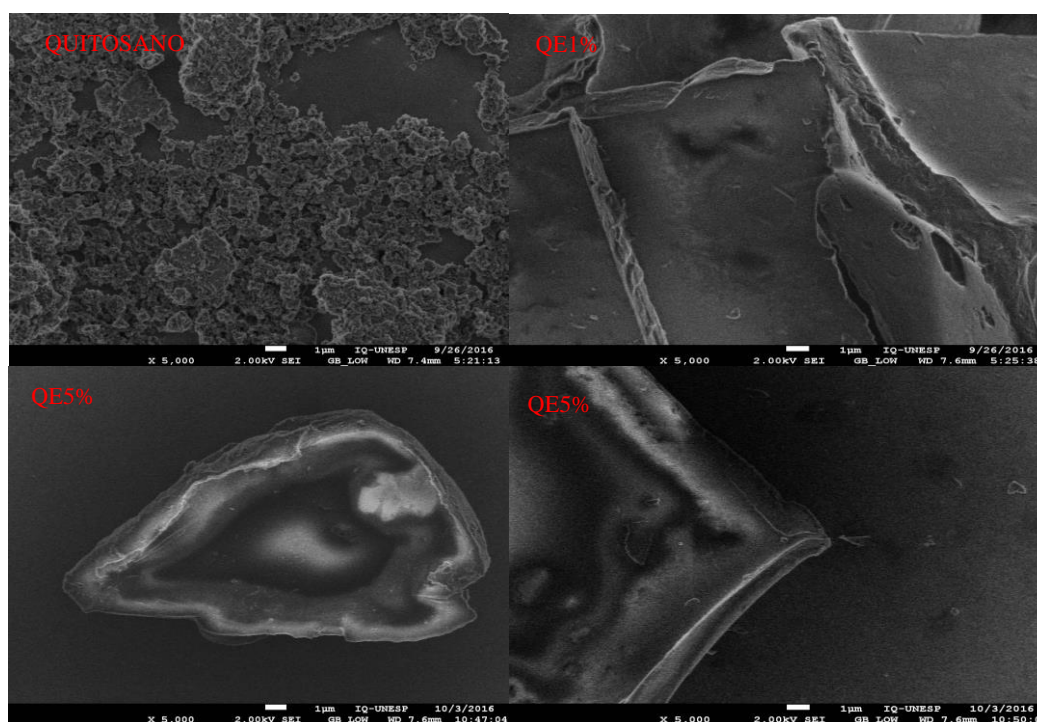


Figura N°24. Imágenes SEM de quitosano y quitosano entrecruzado con glutaraldehído (QE1% y QE5%) en un aumento x5000.

La Figura N°24 presenta las micrografías SEM que ilustra la morfología superficial de las micropartículas Quitosano, QE1% y QE5%. En general, este resultado indica claramente que existe una diferencia en la morfología superficial entre quitosano y QE. De hecho, en comparación con la morfología suave, densa y plana del

quitosano [91], la del QE tiene una superficie porosa y poco áspera (Figura 1 (QE1% y QE5%)), lo cual es consistente con estudios anteriores [92-94]. Estos resultados deben atribuirse al entrecruzamiento y al grado de desacetilación que son los que influyen en el tamaño y la morfología superficial del QE [94,95].

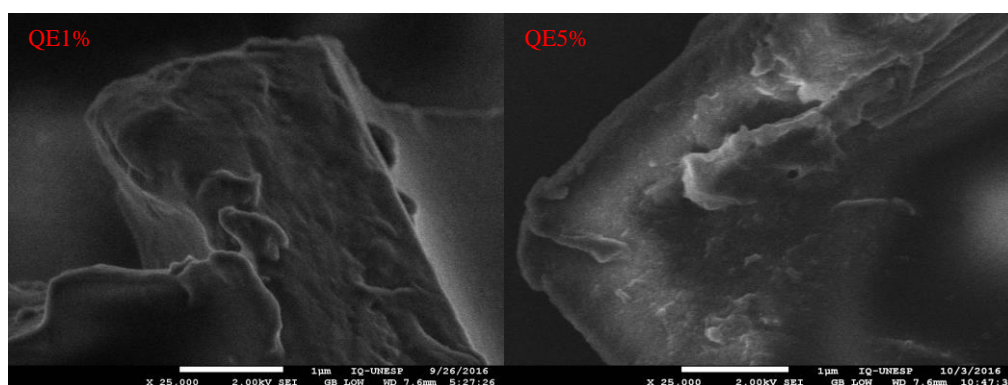


Figura N°25. Imágenes SEM de QE1% y QE5% en un aumento x25000.

También se puede observar la diferencia en la morfología superficial QE1% y QE5% (Figura N°25) esto se da debido al porcentaje de entrecruzamiento con glutaraldehído, este entrecruzante puede aumentar la rugosidad de la superficie de QE aumentando el porcentaje de glutaraldehído, lo que indica que la reacción ha tenido lugar en la superficie. Además, la estructura porosa de QE puede ofrecer más sitios de adsorción para adsorbatos, que generalmente apoyan el hecho de que Quitosano entrecruzado con glutaraldehído ha sido ampliamente estudiado en la absorción de metales pesados [96-97], como también en la administración de fármacos [95]. Además, QE con una superficie algo rugosa y una estructura de poros más abiertos podría suponer que es favorable para interactuar con el ADN a cierto punto, debido que la rugosidad de una superficie también puede evitar la interacción del adsorbato

con el adsorbente, lo que puede explicarse con los resultados de las isothermas de adsorción.

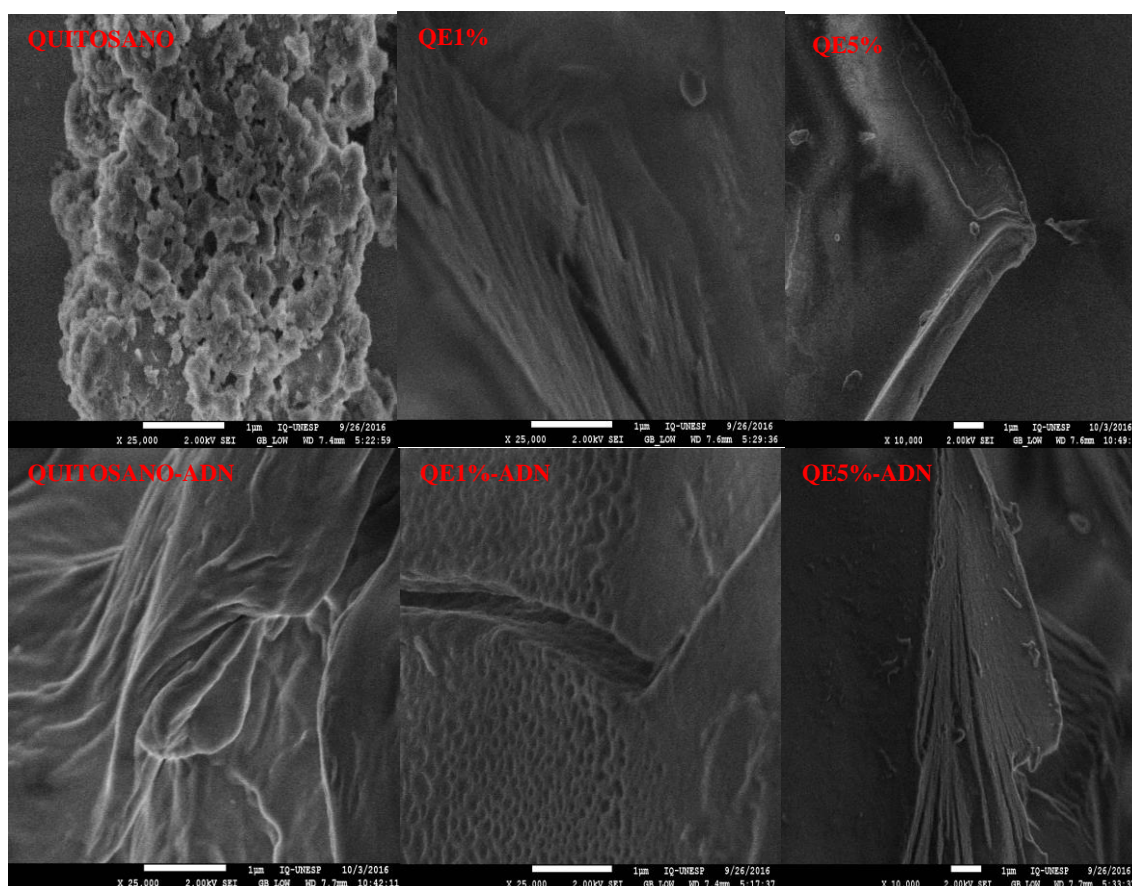


Figura N°26. Imágenes SEM comparativas micropartículas de Quitosano-ADN, QE1%-ADN y QE5%-ADN, aumento x10000 y x25000.

En la figura N° 26 se compara las micropartículas quitosano, QE1% y QE5% con y sin ADN, se puede observar que la morfología superficial de las micropartículas sufren cambios, una posible evidencia que el ADN estas siendo adsorbido en la superficie de estas. También se observa en la imagen SEM de Quitosano-ADN que el cambio de la morfología es muy evidente una posible explicación a esto es q los grupos amino del quitosano interactúan con el ADN aglomerando las micropartículas de quitosano. En QE1%-ADN también se puede evidenciar el cambio en la morfología

superficial evidenciando la posible adsorción de ADN, esto puede estar generando una mayor rugosidad de la superficie inicial de QE1%, lo mismo se evidencia para QE5%-ADN.

4.10 Isotermas de adsorción

El proceso de adsorción de ADN en un medio, implica la separación del soluto (adsorbato) de la disolución y su concentración en la superficie de un sólido (adsorbente), hasta que se establezca un equilibrio dinámico en dicha superficie, esto se da entre la concentración de soluto que permanece en disolución y la concentración superficial del soluto. En el equilibrio, existe una distribución definida de soluto entre las fases líquida y sólida. La relación de distribución o partición es una medida de la posición del equilibrio en el proceso de adsorción. La manera usual de describir esta distribución es expresar la cantidad de sustancia adsorbida por unidad en masa de adsorbente, q_e , como una función de la concentración residual de equilibrio de la sustancia que permanece en la fase líquida, C_f . La ecuación de este tipo se denomina isoterma de adsorción. Las isotermas experimentales son útiles para describir la capacidad de adsorción y así, facilitar la evaluación de la viabilidad del proceso para una determinada aplicación, como también, para determinar unas condiciones de trabajo óptimas.

$$q_e = \left(\frac{C_f - C_0}{mg(MP)} \right) * V = \frac{ug(ADN)}{g(MP)} \dots \dots (26)$$

Donde:

q_e : el q de retención

C_o : concentración inicial de ADN

C_f : concentración final de ADN

m : cantidad de micropartículas (MP)

V : volumen empleado de las soluciones

Para la construcción de las isothermas se partió de soluciones con concentraciones diferentes de ADN: 2, 5, 10, 20, 40, 80, 100, 200 y 400 ng/uL. En todas las disoluciones, se trabajó a un pH ≈ 7 , una vez transcurrido el tiempo de contacto (30min agitación y 30 min de centrifugación) se analizó la concentración de la fase líquida en el equilibrio (C_f) y la dosis de adsorbente, luego se calculó el valor de q_e con lo que se obtuvo las isothermas correspondientes grafico N°26.

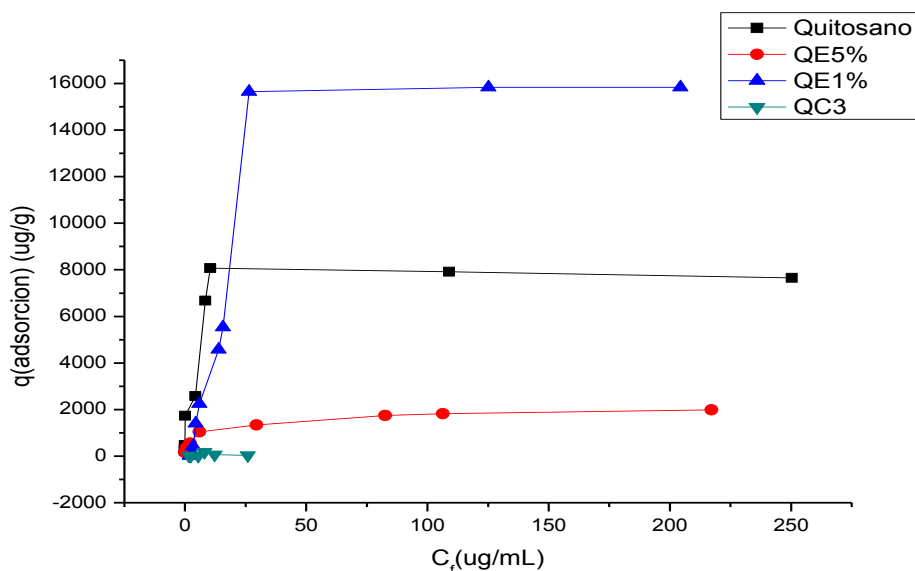


Gráfico N°26. Isotherma de adsorción de ADN de quitosano, QE y QC.

El grafico N°26 muestran las isotermas de quitosano y los tipos de quitosano modificado (QE1%, QE5% y QC3), que representa la relación de las capacidades de adsorción de ADN (q) expresado en μg de ADN retenido por gramo de quitosano o quitosano modificado en una soluciones de ADN en agua ultrapura. Teniendo en cuenta las razones de impregnación, se aprecia que el comportamiento de las isotermas son ascendentes hasta una concentración aproximada, que varía de acuerdo al tipo de adsorbente (quitosano, QE1%, QE5% y QC3). También se evidencia que la muestra QE1% es la que presenta mayor capacidad de adsorción de ADN de toda la serie, con un valor máximo de $q = 15755.3\mu\text{g/g}$ (tabla N°10). Una posible explicación a las variaciones en la capacidad de adsorción entre QE1% y QE5% están relacionados con la variación de la superficie de los sorbentes. Es interesante observar que las isotermas para los polímeros modificados varían considerablemente, de acuerdo con la tabla N°9, esto puede ser atribuido a propiedades como el peso molecular y la polidispersidad del polímero de partida, también los entecruzamientos Quitosano-GL pueden tener una mayor porosidad textural [98], que está relacionado al contenido de glutaraldehído, por otro lado, también los efectos de hidratación contribuyen al sorbente pues presentan una mayor hinchazón, que influirá en la homogeneidad de la superficie dando una mayor accesibilidad del sorbente hacia los adsorbatos en los dominios de los microporos superficiales y sitios de adsorción accesibles [98]. Casi todas las isotermas presentan un comportamiento inicial ascendente evidente a excepción de la muestra QC, inicialmente se pensaba que QC tendría mayor adsorción debido a que es un policomplejo [99], probablemente debido a que las interacción ADN-QC se da por orígenes electrostáticos los cuales son muy sensibles a variaciones de pH y concentraciones [99]. Cabe mencionar que los análisis realizados a los blancos de

todos los experimentos permitieron comprobar las pérdidas de ADN, debidas a causas diferentes al proceso de adsorción.

Nombre	q($\mu\text{gADN/gMP}$)
Quitosano	8030.83
QE1%	15755.3
QE5%	1981.21
QC	141.61

Tabla N°10. Valores máximos de q de adsorción para quitosano, QE y QC.

Los resultados alcanzados (graficoN°26) parecen poner de manifiesto que no existió influencia de la concentración inicial de sustrato, ya que todos los puntos aparentan encontrarse sobre la misma isoterma, que evidencia el establecimiento de un reparto favorable en el equilibrio entre las fase sólida y líquida. La hipótesis de que todos los puntos experimentales obtenidos en el estudio de la influencia de la concentración inicial de sustrato correspondiesen a una misma isoterma se debía comprobar con los resultados de los ajustes a los modelos de adsorción.

4.11 Modelos de isotermas de adsorción

La isoterma de adsorción indica cómo las moléculas de adsorbato interactúan con el adsorbente en el equilibrio de la fase líquida como una función de la

concentración de adsorbato. En este estudio del equilibrio, los datos obtenidos para la adsorción de ADN en QE fueron los mejores y se analizaron con los modelos de isotermas de Langmuir y Freundlich.

La forma lineal de la ecuación isoterma de Langmuir se da como:

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{Q^0} + \frac{1}{bQ^0} \frac{1}{C_e} \dots\dots(27)$$

Donde Q^0 es la concentración de adsorbato por peso unitario de adsorbente que forma una monocapa completa en la superficie, es decir, la capacidad límite de adsorción; y b , una constante del modelo, también llamada coeficiente de adsorción, que se encuentra relacionada con la entalpía de adsorción. La ecuación (27) indica que, si se cumple el modelo, al representar la inversa de q_e frente a la inversa de C_e se obtendrá una línea recta de ordenada en el origen $1/Q^0$ y pendiente igual a $1/bQ^0$.

Los resultados obtenidos en los experimentos de contacto se intentaron ajustar al modelo de Langmuir de linealización (ecuación 2). Para el caso de QE este modelo no se cumplió de manera aceptable, obteniéndose “líneas quebradas”. Esta diferencia de pendientes, se suele relacionar con variaciones en el calor de adsorción, pudiéndose considerar prácticamente constante en un intervalo. [100]

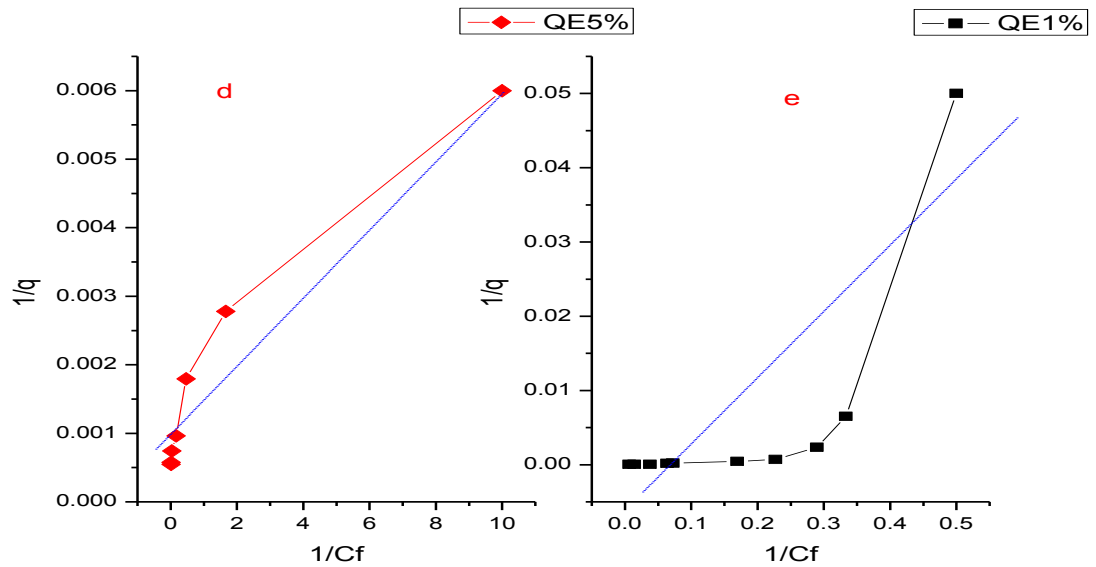


Gráfico N°27. Linealización de Langmuir de QE5% y QE1%

Sin embargo, el modelo de Freundlich ajustó con mayor eficiencia los resultados obtenidos en los ensayos de adsorción. Como se puede ver en la Figura N°6, los datos experimentales cumplen bastante bien con lo predicho por la ecuación (4) la cual describe mejor la adsorción sobre superficies heterogéneas y confirman lo que indicaba la Figura N°4, se podría afirmar que no existió influencia de la concentración inicial de sustrato en el sistema estudiado bajo las condiciones de trabajo consideradas, ya que todos los puntos caen aproximadamente sobre una misma recta.

Isoterma de Freundlich la ecuación se muestra en su forma lineal:

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \dots (28)$$

Donde, K_F y n son constantes características del sistema. Éste es un modelo empírico, aunque se admite que K_F es una indicación aproximada de la capacidad de adsorción y $1/n$, de la intensidad de adsorción. De manera que, según la ecuación (28), al representar $\log q_e$ frente a $\log C_e$, se obtendrá una línea recta de pendiente $1/n$ y ordenada en el origen $\log K_F$.

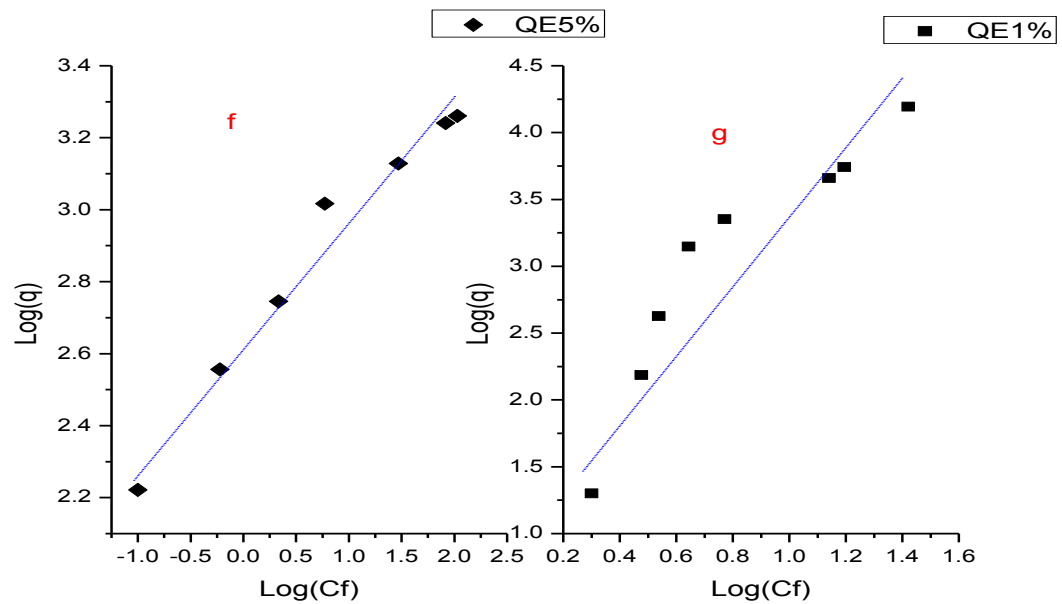


Gráfico N°28. Linealización Freundlich

Modelo de equilibrio	Parámetro	QE1%	QE5%
Isoterma Langmuir	b (L/mg)	0,05072	0,2
	$q_{\max} = Q^0$ (ug/g)	1428,57	1000
	r^2	0,6432	0,9289
	R_L	0.046	0.012
Isoterma Freundlich	$K_F(L/g)$	51,191	421.,405
	n	0,5654	2,945
	r^2	0,8892	0,9724

Tabla N°11. Parámetro de los modelo de equilibrio de adsorción de ADN en QE

El estudio del equilibrio de adsorción la tabla N°11 nos muestras los datos obtenidos para la adsorción de ADN en micropartículas de QE1% y QE5% fueron analizadas considerando los modelos de isotermas de Langmuir, y Freundlich.

La isoterma de Langmuir es frecuentemente evaluada por un factor de separación, R_L , que se define como sigue:

$$R_L = \frac{1}{1+bc_0} \dots \dots \dots (29)$$

Donde C_0 en este caso es la concentración de soluto inicial más alta. El valor del factor de separación indica el tipo de isoterma y la Naturaleza del proceso de adsorción. Considerando el valor R_L , la adsorción Pueden ser desfavorables ($R_L > 0$), lineales ($R_L = 1$), favorables ($0 < R_L < 1$) o Irreversible ($R_L = 0$). En nuestros resultados observamos que los valores de R_L (Tabla N°11) para QE1% y QE5% son favorables, pero los gráficos de linealidad (gráfico N° 27) son desfavorables.

La isoterma de Freundlich es puramente empírica y describe mejor la adsorción en superficies heterogéneas, sus parámetros de su ecuación linealizada (ecu (28)) Donde K_F (l / g) es constante de Freundlich y n es exponente de Freundlich. Estos parámetros se determinan a partir de un registro logarítmico q_e versus $\log C_e$, en nuestros valores (tabla N°11) el valor de r^2 nos muestra mejores resultados de linealidad para QE1% y QE5% (gráfico N°28) y los valores de K_F son valores no exactos de la capacidad adsorción.

Efecto del porcentaje de GL en el adsorbente

Los resultados de los experimentos con diferentes porcentajes de GL en el adsorbente se presentan en la Figura (QE1% y QE5%), un aumento en el porcentaje de GL en el adsorbente disminuye la capacidad de adsorción, la cantidad de adsorbente modificado utilizado fue 3 mg en ambos casos, se trabajó a las mismas condiciones, en QE1% aumenta la captación de ADN con respecto al QE5%. Hay una gran probabilidad que todos los sitios activos sobre la superficie adsorbente son entonces ocupados y aumento de la dosis GL disminuye la adsorción de ADN [101]

CONCLUSIONES

- i) Se prepararon diferentes tipos de quitosano modificados químicamente (QE, QC y QCE) partiendo de quitosano comercial los cuales se caracterizaron por diferentes técnicas analíticas como: peso molecular viscosimétrico (**455KDa**), grado de desacetilación (**72.6%**) y grado de cuaternización para QC (QC1-3) (**228.57, 242.7 y 268.44 $\frac{mg \text{ de grupos cuaternizantes}}{g \text{ de quitosano}}$**) e instrumentales como: **FTIR, DRX, TGA y SEM**, obteniendo resultados muy comparables a la literatura estudiada que confirman haber obtenido las modificaciones correspondientes.
- ii) Las pruebas de adsorción nos demostraron que el QE1% fue el que mejor resultado nos dio (**15755.3 $\frac{\mu g \text{ de ADN}}{g \text{ de QE1\%}}$**) en la captación de ADN.
- iii) También este estudio reveló que el proceso de adsorción de ADN encaja con el modelo cinético isoterma de Freundlich, el cual me mejor describe la adsorción en superficies heterogéneas como es el caso de QE, la cual está determinada por los siguientes parámetros como: Q_0 (concentración de adsorbato por peso unitario de adsorbente), b (coeficiente de adsorción) y r (constante de linealidad de la recta)

Capítulo 5

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Yazdani-Pedram M., Retuert J. y Quijada R. Hydrogels based on modified chitosan: Synthesis and swelling behavior of poly (acrylic acid) grafted chitosan. *Macromol. Chem. Phys.* 2000; 201: 923-930.
- [2] Pascaline Rahelivaoa M., Andriamanantoanina H., Heyraudb, Marguerite Rinaudo A., Structure and properties of three alginates from Madagascar seacoast algae. 2013; 32: 143-146.
- [3] Repoa E., Koivula R., Harjulab R., Sillanpää M., Effect of EDTA and some other interfering species on the adsorption of Co(II) by EDTA-modified chitosan. 2013; 321:93–102
- [4] Bhatnagar A., Anastopoulos I., Adsorptive removal of bisphenol A (BPA) from aqueous solution: A review. 2017; 168: 885–902.
- [5] Soundararajan, S. Reddy, B.S.R. and Rajadurai, S. *Polymer*, 31 2 (1990) 366–370.
- [6] Zhou Z., Linb S., Yuea T., Leeb T.-C., Adsorption of food dyes from aqueous solution by glutaraldehyde cross-linked magnetic chitosan nanoparticles. 2014; 126:133–141.
- [7] Li K., Li P., Cai J., Xiao S., Yang H., , Li A Efficient adsorption of both methyl orange and chromium from their aqueous mixtures using a quaternary ammonium salt modified chitosan magnetic composite adsorbent. 2016; 154:310–318.
- [8] Bordi F., Chronopoulouc L., Paloccic C., Bomboia F., Di Martinoe A., Cifanid N., Pompilid B., Ascenzionid F., Sennatoa S., Chitosan–DNA complexes: Effect of molecular parameters on the efficiency of delivery. 2014; 460:184–190.

- [9] Amaduzzi F., Bomboi F., Bonincontro A., Bordi F., Casciardi S., Chronopouloud L., Diociaiuti M., Muraf F., Palocci C., Sennatoa S., Chitosan–DNA complexes: Charge inversion and DNA condensation. 2014; 114:1–10.
- [10] Marguerite R. “Chitin and chitosan: Properties and applications. 2006; 31: 603-63
- [11] L. Velasquez, Revista Iberoamericana de Polímeros, 2003;40: 2.
- [12] Skjak-Braek G., anthonsen T., Sandford P., Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Application, New York, Elsevier. 1989; 23-101.
- [13] N. Pacheco, “Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos”, tesis para obtener el grado de doctor en biotecnología, UAM, México Iztapalapa. 2006; 08.
- [14] C. Diaz, “Preparación y caracterización de la sal de quitosano cuaternizado y su entrecruzamiento con glutaraldehído para la sorción del Cromo (VI) de soluciones acuosas”, Tesis para optar el título profesional de licenciado en ciencias con mención en Química, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima-Perú, 2011.
- [15] Ma B., Zhang M., He C., Sun J. New binary ionic liquid system for the preparation of chitosan/cellulose composite fibers. 2012; 88:347–351
- [16] Mi F., Shyu S., Kuan C., Lee S., Lu K., Jang S. Chitosan–Polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of

- anticancer drug. I. Effect of phosphorous polyelectrolyte complex and enzymatic hydrolysis of polymer. 1999; 74(7):1868-1879.
- [17] Martínez-Ruvalcaba A., Sánchez-Díaz C. Swelling characterization and drug delivery kinetics of polyacrylamide-co-itaconic acid/chitosan hydrogels. 2009; 3: 25–32
- [18] MD Kirk A Roberts. Helicopter transport of trauma victims: Does a physician make a difference?: Hamman BL, Cue JI, Miller FB, et al J Trauma 1991; 31: 490–494 Apr 1991. 1991; 20: 935-936.
- [19] Li Z., Ramay R., Hauch D., Xiao D., Zhang M., Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. 2005; 26: 3919–3928.
- [20] Tan H., Chub R., Payne A., Marra G., Injectable in situ forming biodegradable chitosan–hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. 2009; 30:2499–2506.
- [21] Hori Y., Winans M., Irvine J. Modular injectable matrices based on alginate solution/microsphere mixtures that gel in situ and co-deliver immunomodulatory factors. 2009; 5: 969–982.
- [22] Tyagi A., D. del Agua, Penzkofera A., García O., Sastre R., Costela A., García-Moreno I. Photophysical characterization of pyromethene 597 laser dye in cross-linked silicon-containing organic copolymers. 2007; 342: 201–214.
- [23] Nunes C., Maricato E., Cunha Â., Nunes A., Lopes da Silva A., Coimbra A. Chitosan–caffeic acid–genipin films presenting enhanced antioxidant activity and stability in acidic media. 2013; 9: 236–243

- [24] Crescenzi, V., Imbriaco D., Lárez C., Dentini M. y Ciferri A. Novel types of polysaccharidic assemblies. 1995; 196: 2873-2880.
- [25] Lárez C., Crescenzi V., Dentini M. y Ciferri A. Assemblies of amphiphilic compounds over rigid polymers: 2. Interaction of sodium dodecylbenzenesulfonate with chitosan-scleraldehyde gels. 1995; 2: 141-147.
- [26] Paradossi G., Lisi R., Paci M. y Crescenzi V. New chemical hydrogels based on poly(vinyl alcohol). 1996; 34:3417-3425.
- [27] Yazdani-Pedram M., Retuert J. y Quijada R. Hydrogels based on modified chitosan, 1. Synthesis and swelling behavior of poly(acrylic acid) grafted chitosan. 2000; 201: 923.
- [28] Wu Y., Wang Z., Liu X., Shen X., Zheng Q., Xue Q., Kim JK. Ultralight Graphene Foam/Conductive Polymer Composites for Exceptional Electromagnetic Interference Shielding. 2017; 9(10):9059-9069
- [29] Jia Z., Shen D. y Xu W. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. 2001; 333:1-6.
- [30] Wan A., Sun Y., Li W. Transmission electron microscopy and electron diffraction study of BSA-loaded quaternized chitosan nanoparticles. 2008; 86B: 197-207
- [32] Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. 2006; 31:603-632

- [33] Navarro P., Millán E. y Lárez C. Resultados no publicados. Grupo de Electroquímica del Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes. Venezuela.
- [34] Konovalova I., Stepanova N., Vasilevskii P., Bereza I., Intensification of the Flotation Treatment of Water with Natural Polyelectrolytes. 2001; 74(3): 449-454.
- [35] D. García, “Materiales macroporosos biodegradables basados en quitosano para la ingeniería tisular”, tesis para optar el título de Doctora de Químico, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 2008.
- [36] Kumar M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. 2000; 46; 1-27
- [37] Prashanth K.V.H., Tharanathan R.N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview Trends Food Sci. Technol. 2007; 18:117-131.
- [38] Lahji A., Sorhabi A., Hungerford D. Frondoza C. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. 2000; 6:586-596.
- [39] Mi F., Shyu S., Kuan C., Lee S., Lu K., Jang S., Chitosan–Polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. I. Effect of phosphorous polyelectrolyte complex and enzymatic hydrolysis of polymer. 1999; 74(7):1868-1879.

- [40] Matheus R., Belandria M., Vincent B., Linares L. Effect of Chitosan on the Voltametric Response as an Electrochemical Sensor for the Detection of Iodide in Aqueous Solutions. 2014; 4: 2225-7217
- [41] Lárez Velásquez C. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. 2003, 4(2):91-109.
- [42] Jia Z., Shen D. y Xu W. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. 2001; 333 (1): 1-6
- [43] Thanou M., Kotzé A., Scharinghausen T., Luessen H., De Boer A., Verhoef J., Junginger H. J. Control. Release, 64(1-3), (2000) 15-25.
- [44] Poster Sessions-P718- A. Spanos, G. Theocharis, D. Karageorgopoulos*, G. Peppas, D. Fouskakis, M. Falagas (Athens, GR). Early detection of community outbreaks of respiratory tract infections from house-call visits in the metropolitan area of Athens, Greece. pag.132
- [45] Heveline D.M. Follmann Alessandro F. Martins Thatyane M. Nobre Joana D. Bresolin Thelma S.P. Cellet Patr'icia Valderrama Daniel S. Correa Edvani C. Muniz Osvaldo N. Oliveira Jr Extent of shielding by counterions determines the bactericidal activity of N,N,N-trimethyl chitosan salts. 2015; 10:1-25.
- [46] M. Larssona, H. Wei-Chen , H. Meng-Hsuan, W. Yen-Jen, M. Nydénb, C. Shih-Hwa, L. Dean-Mo, et. al., Progress in Polymer Science, (2013) 1307-1328.
- [47] BENAÏSSA H., BENGUELLA H. B. Effect of anions and cations on cadmium sorption kinetic by chitin. Proceeding of international symposium

- an environmental pollutions control and waste managment. Tunis. 2002; 815-822.
- [48] ALSARRA I. A. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics, *Biomaterials*. 2002; 23:3637-3644.
- [49] Karagoz S., Tay T., Ucar S., Erdem M., Activated carbons from waste biomass by sulfuric acid activation and their use on methylene blue adsorption, *Bioresour. Technol.* 2008; 99:6214–6222.
- [50] Ng C., Losso J.N., Marshall W.E., Rao R.M. Freundlich adsorption isotherms of agricultural by-product-based powdered activated carbons in a geosmin–wáter system, *Bioresour. Technol.* 2002; 85:131–135.
- [51] Hameed B.H., Ahmad A.A. Batch adsorption of methylene blue from aqueous solution by garlic peel, an agricultural waste biomass, *J. Hazard. Mater.* 2009; 164: 870–875.
- [52] JOEL. Guide to scanning electron Microscopy, www.jeol.com/sem/docs/sem_guide/tbcontd.html (acceso 02 setiembre 2016)
- [53] www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/FAQ_Beginners-Guide-to-ThermogravimetricnAnalysis_009380C_01.pdf
- [54] Aranaz I., Mengíbar M., Harris R., Paños I., Miralles B., Acosta N., Galed G., Heras Á. Functional characterization of chitin and chitosan. *Curr. Chem. Biol.* 2009; 3: 203–230.

- [55] Suguna M., Kumar N.S., Reddy A.S., Boddu V.M., Krishnaiah A. Biosorption of lead (II) from aqueous solution on glutaraldehyde cross-linked chitosan beads. *Can. J. Chem. Eng.* 2011; 89:833–843.
- [56] Varma A.J., Deshpande S.V., Kennedy J.F. Metal complexation by chitosan and its derivatives: A review. *Carbohydr. Polym.* 2004; 55:77–93.
- [57] Barahuie F., Hussein M.Z., S.A. Gani S.A., Fakurazi S., Zainal Z. Synthesis of protocatechuic acid–zinc/aluminium–layered double hydroxide nanocomposite as an anticancer nanodelivery system *J. Solid State Chem.*, 2015; 221: 21–31
- [58] Leceta I., Guerrero P., Ibarburu I., Dueñas M.T., de la Caba K. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films *J. Food Eng.*, 2013; 116: 889–899
- [59] Nouri M., Khodaiyan F., H. Razavi S., Mousavi M. Improvement of chitosan production from Persian Gulf shrimp waste by response surface methodology *Food Hydrocolloids*, 2016; 59 50-58
- [60] Zhang A.J., Qin Q.L., Zhang H., Wang H.T., Li X., Miao L. Preparation and characterisation of food-grade chitosan from housefly Larvae *Czech Journal of Food Sciences*, 2011; 29: 616–623
- [61] Baxter, A., Dillon. M., Taylor. K.D.A and Roberts. G.A.F., Improved method for IR Determination of Degree of N-acetylation of chitosan. *J. Biol. Macromol.* 1992; 14: 166-169.

- [62] Kasai M.R. Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review. 2009; 57:1667–1676.
- [63] Zhi-Xiang Y., Xun S., Tao G., Hong D., Yao F. Zhi-Rong Z. Randomly 50% N-acetylated low molecular weight chitosan as a novel renal targeting carrier. 2007; 15:269-278.
- [64] Schatz C., Viton C., Delair T., Pichot C., Domard A. Typical Physicochemical Behaviors of Chitosan in Aqueous Solution. 2003; 4: 641–648.
- [65] Wang W., Bo S., Li S., Qin W., Determination of the Mark-Houwink Equation for Chitosan with Different Degrees of deacetylation, *Int. J. Biol. Macromol*, 1991; 13:281-285.
- [66] Li B., Shan C., Zhou Q., Fang Y., Wang Y., Xu F., Han L., Ibrahim M., Guo L., Xie G., Sun G. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Cross-Linked Chitosan-Glutaraldehyde, *M. D.* 2013; 11: 1534-1552
- [67] Mitra T., Sailakshmi G., Gnanamani A., Manda A.B. Preparation and characterization of malonic acid cross-linked chitosan and collagen 3D scaffolds: An approach on non-covalent interactions. *J. Mater. Sci.* 2012; 23:1309–1321.
- [68] Jabli M., Baouab M.H.V., Sintès-Zydowicz N., Hassine B.B. [Dye Molecules/Copper(II)/ Macroporous Glutaraldehyde-Chitosan] Microspheres complex: Surface characterization, kinetic, and thermodynamic investigations. *J. Appl. Polym. Sci.* 2012; 123:3412–3424.

- [69] Yao W.J., Jiao Y., Luo J., Du M.Z., Li Z. Practical synthesis and characterization of mannose-modified chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 2012; 50:821–825.
- [70] Ramachandran S., Nandhakumar S., Dhanaraju M.D. Formulation and characterization of glutaraldehyde cross-linked chitosan biodegradable microspheres loaded with famotidine. *Trop. J. Pharm. Res.* 2011; 10:309–316.
- [71] Knaul J.Z., Hudson S.M., Creber K.A.M. Crosslinking of chitosan fibers with dialdehydes: Proposal of a new reaction mechanism. *J. Polym. Sci. Pol. Phys.* 1999; 37:1079–1094.
- [72] Gupta, K.C.; Jabrail, F.H. Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman. *Carbohydr. Res.* 2006; 341:744–756.
- [73] Oyrton A.C., Monteiro J., Claudio A. Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *Int. J. Biol. Macromol.* 1999; 26:119–128.
- [74] Zhang W., Sun C., Zhao Y., Lui X. One-pot synthesis and characterization of cross-linked quaternized chitosan microspheres as protein adsorbent. *I. J. Biological Macromolecules* 2011; 49; 688–692
- [75] Oyrton A.C.M.J., Claudio A. Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. 1999; 26:119–128.

- [76] Xu Y., Du Y., Huang R., Gao L. Preparation and modification of N-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride nanoparticle as a protein carrier. 2003; 24:5015–5022.
- [77] Xu W., Yang H., Liu Y., Yang Y., Wang P., Kim SH., Ito S., Yang C., Wang P., Xiao MT., Liu LX., Jiang WQ., Liu J., Zhang J.Y., Wang B., Frye S., Zhang Y., Xu Y.H., Lei Q.Y., Guan K.L., Zhao S.M., Xiong Y. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. 2010; 12:14.
- [78] Brunatti C., De Napoli H. Titulaciones conductimétricas. [Revista virtual] pag.5,PDFen:[http://materias.fi.uba.ar/6305/download/Titulaciones Conductimétricas](http://materias.fi.uba.ar/6305/download/Titulaciones%20Conductimétricas).
- [79] Zhang W., Sun C., Zhao Y., Lu X. One-pot synthesis and characterization of cross-linked quaternized chitosan microspheres as protein adsorbent, I. J. of Biological Macromolecules. 2011; 49:688– 692.
- [80] Oyrton A.C.M.J., Claudio A. Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. 1999; 26:119–128.
- [81] Xu Y., Du Y., Huang R., Gao L. Preparation and modification of N-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride nanoparticle as a protein carrier. 2003; 24:5015–5022.
- [82] B. Sousa, M. Cerqueira, J. Martins, A. Casareigo, J. Teixeira, A. Vicente. Influence of electric fields on the structure of chitosan edible coatings. Food Hydrocall. 2016; 24: 330-335.

- [83] Zong Z., Kimura Y., Takahashi M., Yamano H., Characterization of chemical and solid state structures of acylated chitosans. 2000; 41:899.
- [84] Croisier F., Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. 2013; 49:780–792.
- [85] Jaworska M., Kula K., Sakurai K., Gaudon P., Guibal E. Influence of Chitosan Characteristics on polymer Properties I: Crystallographic Properties, *Polymer International*. 2003; 52:198-205.
- [86] Jaworska M., Kula K., Guibal E. Influence of Chitosan Characteristics on Polymer Properties: II. Platinum Sorption Properties, *Polymer International*. 2003; 52:206-212.
- [87] Maza I., Jacinto C. Caracterización Físicoquímica de Quitosano para su aplicación como Biosorbente de Metales, *REVCUNI*, 2007; 11:1-5.
- [88] Espadin A. U., “Preparación y caracterización de materiales a base de quitosano biológico-químico y derivados del ácido láctico”, tesis para optar el grado de Maestro en Biotecnología, 2012; 06.
- [89] Corazzari I., Nistico R., Turci F., Faga M. G., Franzoso F., Tabasso S., Magnacca G Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. 2015; 112:1-9.
- [90] Tahtat D., Mahlous M., Benamer S., Khodja A. N., Oussedik-Oumehdi H., Laraba-Djebari F. Oral delivery of insulin from alginate/chitosan crosslinked by glutaraldehyde. 2013; 58:160-168.

- [91] Trimukhe K.D., Varma A.J. A morphological study of heavy metal complexes of chitosan and crosslinked chitosans by SEM and WAXRD. *Carbohydr. Polym.* 2008; 71:698–702.
- [92] Jabli M., Baouab M.H.V., Sintès-Zydowicz N., Hassine B.B. [Dye Molecules/Copper(II)/ Macroporous Glutaraldehyde-Chitosan] Microspheres complex: Surface characterization, kinetic, and thermodynamic investigations. *J. Appl. Polym. Sci.* 2012; 123:3412–3424.
- [93] Zhang Z.T., Chen L., Ji, J.M., Huang Y.L., Chen D.H. Antibacterial properties of cotton fabrics treated with chitosan. *Text. Res. J.* 2003; 73: 1103–1106.
- [94] Mirzaei B.E., Ramazani S.A.A., Shafiee M., Danaei M. Studies on glutaraldehyde crosslinked chitosan hydrogel properties for drug delivery systems. *Int. J. Polym. Mater.* 2013; 62:605–611.
- [95] Aranaz I., Mengíbar M., Harris R., Paños I., Miralles, B., Acosta N., Galed G., Heras Á. Functional characterization of chitin and chitosan. *Curr. Chem. Biol.* 2009; 3:203–230.
- [96] Suguna M., Kumar N.S., Reddy A.S., Boddu V.M., Krishnaiah A. Biosorption of lead (II) from aqueous solution on glutaraldehyde cross-linked chitosan beads. *Can. J. Chem. Eng.* 2011; 89:833–843.
- [97] Varmaa A.J., Deshpande S.V., Kennedy J.F. Metal complexation by chitosan and its derivatives: A review. *Carbohydr. Polym.* 2004; 55, 77–93.

- [98] Wilson L. D., Mohamed M. H., Headley J. V. Surface area and pore structure properties of urethane-based copolymers containing β -cyclodextrin. *J. of Colloid and Interface Science*, 2011; 357:215-222.
- [99] Bordi F., Chronoulou L., Palocci C., Bomboi F., Di Martino A., Cifani, B N. Pompili, F. Ascenzioni, S. Sennato. Chitosan–DNA complexes: Effect of molecular parameters on the efficiency of delivery. *Colloids and Surfaces*. 2014; 460: 184-190.
- [100] Oskolkov N. N., Potemkin I. I. Complexation in Asymmetric Solutions of Oppositely Charged Polyelectrolytes: Phase Diagram. *Macromolecules*. 2007; 40: 8423-8429.
- [101] Kakavandi B., Kalantary R., Farzadkia M., Mahvi A., Esrafil A., Azari A., Yari R., Javid A. Enhanced chromium (VI) removal using activated carbon modified by zero valent iron and silver bimetallic nanoparticles. 2014; 12: 115.
- [102] Murthy NS. Recent developments in polymer characterization using x-ray diffraction. *Rigaku J*. 2004; 21:15-24.
- [103] Sharma R., Bisen DP., Shukla U., Sharma BG. X-ray diffraction: a powerful method of characterizing nanomaterials. *Recent Res Sci Technol* 2012; 4(8):77-9.
- [104] Abhilash V. Rajender N. Suresh K. X-ray diffraction spectroscopy of polymer nanocomposites. 2016; 4:410-451

Capítulo 6

ANEXOS

ANEXO N°1

A.1 Grado de desacetilación.

A.1.1 Método potenciométrico.

A.1.1.1 Datos y gráficos obtenidos

Tabla N° valores de la Titulación potenciométrica y determinación de la primera derivada

Titulación potenciométrica		Valores para obtener la primera derivada	
pH	V(NaOH) (mL)	$V=(V1+V2)/2$ (mL)	DpH/DV
1.6	0		
1.64	2	1	0.02
1.68	4	3	0.02
1.73	6	5	0.025
1.78	8	7	0.025
1.83	10	9	0.025
1.88	12	11	0.025
1.94	14	13	0.03
2.02	16	15	0.04
2.1	18	17	0.04
2.19	20	19	0.045
2.31	22	21	0.06
2.46	24	23	0.075
2.48	24.2	24.1	0.1
2.5	24.4	24.3	0.1
2.52	24.6	24.5	0.1
2.54	24.8	24.7	0.1
2.57	25	24.9	0.15
2.59	25.2	25.1	0.1
2.61	25.4	25.3	0.1
2.64	25.6	25.5	0.15
2.66	25.8	25.7	0.1

2.69	26	25.9	0.15
2.72	26.2	26.1	0.15
2.75	26.4	26.3	0.15
2.78	26.6	26.5	0.15
2.82	26.8	26.7	0.2
2.86	27	26.9	0.2
2.9	27.2	27.1	0.2
2.95	27.4	27.3	0.25
3	27.6	27.5	0.25
3.05	27.8	27.7	0.25
3.12	28	27.9	0.35
3.19	28.2	28.1	0.35
3.27	28.4	28.3	0.4
3.37	28.6	28.5	0.5
3.49	28.8	28.7	0.6
3.64	29	28.9	0.75
3.8	29.2	29.1	0.8
3.99	29.4	29.3	0.95
4.15	29.6	29.5	0.8
4.29	29.8	29.7	0.7
4.41	30	29.9	0.6
4.52	30.2	30.1	0.55
4.6	30.4	30.3	0.4
4.69	30.6	30.5	0.45
4.75	30.8	30.7	0.3
4.81	31	30.9	0.3
4.88	31.2	31.1	0.35
4.94	31.4	31.3	0.3
4.99	31.6	31.5	0.25
5.04	31.8	31.7	0.25
5.09	32	31.9	0.25
5.13	32.2	32.1	0.2
5.16	32.4	32.3	0.15
5.21	32.6	32.5	0.25
5.2	32.8	32.7	-0.05
5.26	33	32.9	0.3
5.29	33.2	33.1	0.15
5.33	33.4	33.3	0.2
5.36	33.6	33.5	0.15
5.39	33.8	33.7	0.15
5.41	34	33.9	0.1

5.45	34.2	34.1	0.2
5.49	34.4	34.3	0.2
5.51	34.6	34.5	0.1
5.55	34.8	34.7	0.2
5.58	35	34.9	0.15
5.61	35.2	35.1	0.15
5.78	36.2	35.7	0.17
5.87	37.2	36.7	0.09
5.97	38.2	37.7	0.1
6.1	39.2	38.7	0.13
6.19	40.2	39.7	0.09
6.29	41.2	40.7	0.1
6.41	42.2	41.7	0.12
6.56	43.2	42.7	0.15
6.57	43.4	43.3	0.05
6.58	43.6	43.5	0.05
6.59	43.8	43.7	0.05
6.6	44	43.9	0.05
6.61	44.2	44.1	0.05
6.63	44.4	44.3	0.1
6.65	44.6	44.5	0.1
6.66	44.8	44.7	0.05
6.68	45	44.9	0.1
6.7	45.2	45.1	0.1
6.71	45.4	45.3	0.05
6.72	45.6	45.5	0.05
6.74	45.8	45.7	0.1
6.75	46	45.9	0.05
6.77	46.2	46.1	0.1
6.78	46.4	46.3	0.05
6.8	46.6	46.5	0.1
6.82	46.8	46.7	0.1
6.84	47	46.9	0.1
6.86	47.2	47.1	0.1
6.87	47.4	47.3	0.05
6.89	47.6	47.5	0.1
6.91	47.8	47.7	0.1
6.93	48	47.9	0.1
6.96	48.2	48.1	0.15
6.98	48.4	48.3	0.1
7	48.6	48.5	0.1

7.02	48.8	48.7	0.1
7.05	49	48.9	0.15
7.08	49.2	49.1	0.15
7.11	49.4	49.3	0.15
7.15	49.6	49.5	0.2
7.19	49.8	49.7	0.2
7.26	50	49.9	0.35
7.38	50.2	50.1	0.6
7.49	50.4	50.3	0.55
7.63	50.6	50.5	0.7
7.81	50.8	50.7	0.9
8.01	51	50.9	1
8.21	51.2	51.1	1
8.33	51.4	51.3	0.6
8.48	51.6	51.5	0.75
8.65	51.8	51.7	0.85
8.85	52	51.9	1
9	52.2	52.1	0.75
9.21	52.4	52.3	1.05
9.45	52.6	52.5	1.2
9.64	52.8	52.7	0.95
9.79	53	52.9	0.75
9.95	53.2	53.1	0.8
10.13	53.4	53.3	0.9
10.28	53.6	53.5	0.75
10.38	53.8	53.7	0.5
10.45	54	53.9	0.35
10.51	54.2	54.1	0.3
10.57	54.4	54.3	0.3
10.63	54.6	54.5	0.3
10.68	54.8	54.7	0.25
10.73	55	54.9	0.25
10.77	55.2	55.1	0.2
10.81	55.4	55.3	0.2
10.85	55.6	55.5	0.2
10.88	55.8	55.7	0.15
10.92	56	55.9	0.2
10.96	56.2	56.1	0.2
11	56.4	56.3	0.2
11.04	56.6	56.5	0.2
11.62	58.6	57.6	0.29

11.96	60.6	59.6	0.17
12.17	62.6	61.6	0.105
12.31	64.6	63.6	0.07
12.43	66.6	65.6	0.06
12.52	68.6	67.6	0.045
12.6	70.6	69.6	0.04
12.67	72.6	71.6	0.035
12.73	74.6	73.6	0.03
12.77	76.6	75.6	0.02
12.82	78.6	77.6	0.025
12.85	80.6	79.6	0.015

Graficando los datos obtenidos obtenemos dos gráficas la valoración potenciométrica y de su primera derivada de este, para obtener los puntos de inflexión X y Y

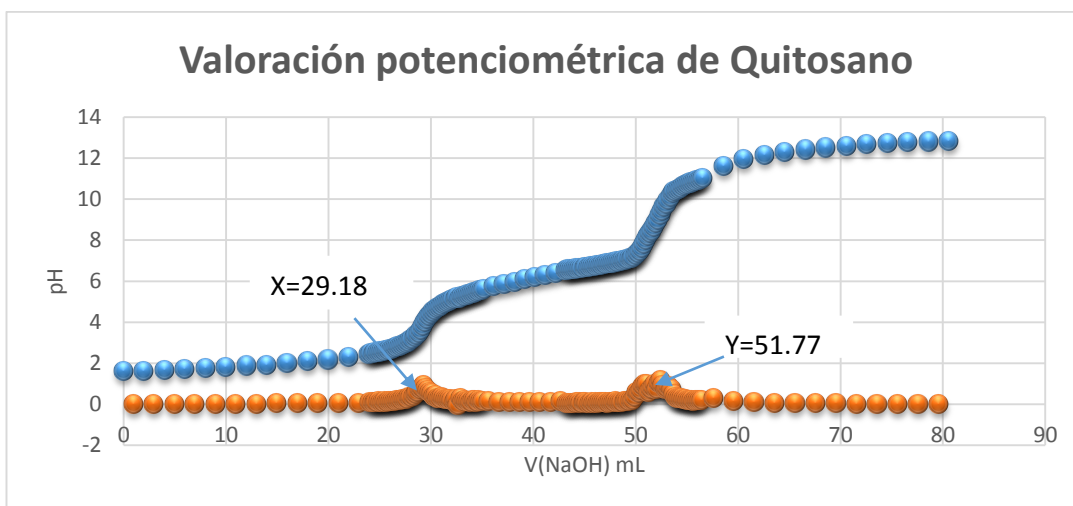
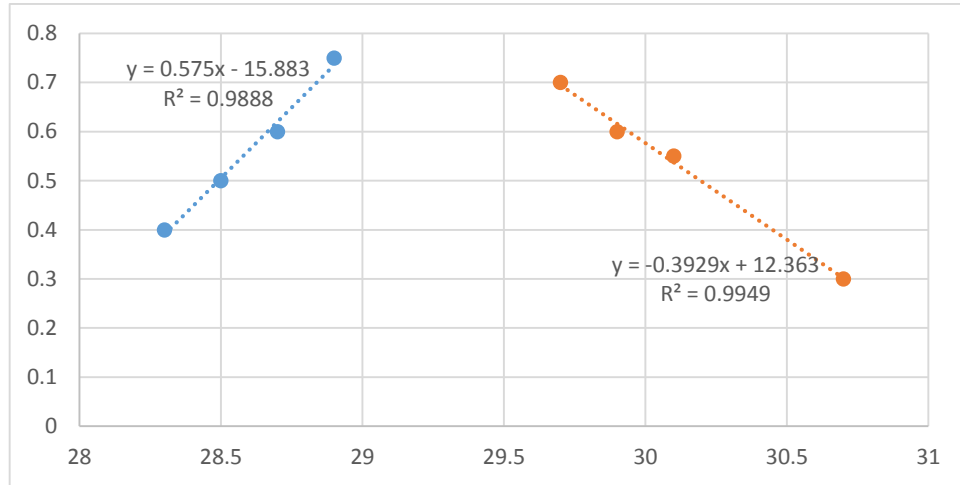


Gráfico de los valores de la valoración potenciométrica del quitosano con NaOH 0.0990M (línea azul) y el método de la primera derivada (línea roja).

Haciendo aproximaciones para obtener los puntos de inflexión X y Y se tomaron puntos en el entorno de los puntos de inflexión y se calculó la linealidad de estos y el valor del intercepto de dos rectas, fue el punto de inflexión más preciso.

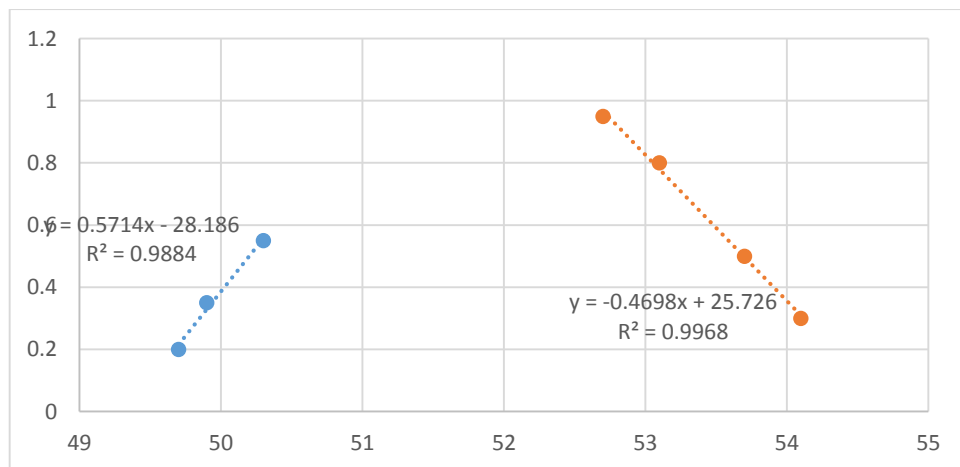
Para el punto de inflexión X tenemos.



Igualando rectas obtenemos:

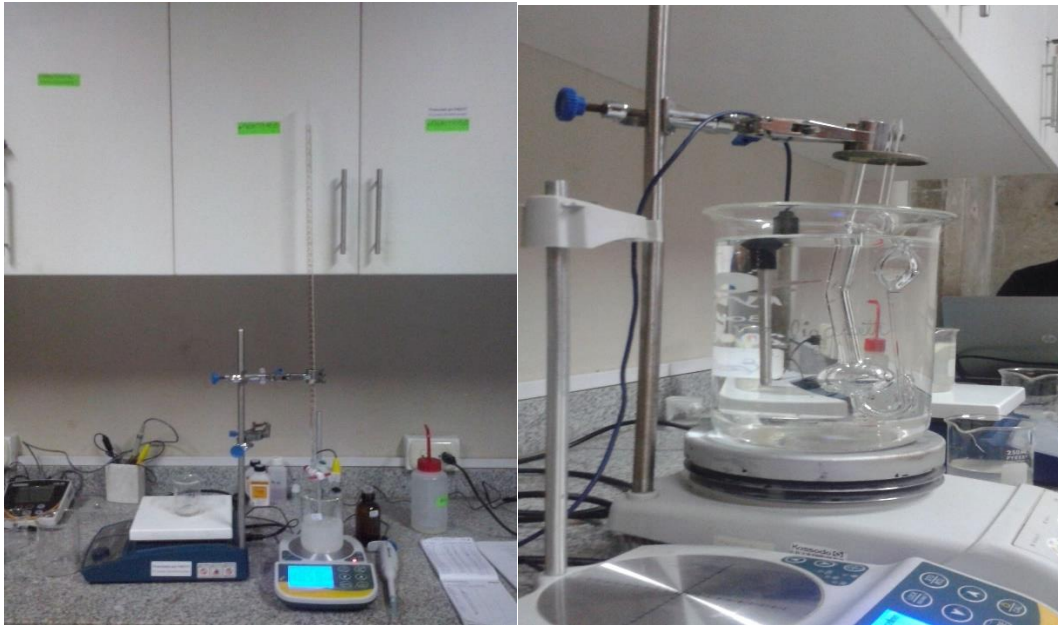
$$\text{Pto (1)}=X= 29.18$$

Para el punto de inflexión Y tenemos.



Igualando rectas obtenemos:

$$\text{Pto (2)}=Y= 51.77$$



Imágenes del sistema para realizar la titulación potenciométrica (izquierda) y del sistema para determinar la masa viscosimétrica (derecha)

ANEXO N°2

B.1 Imágenes del entrecruzamiento de quitosano con GL.



Imágenes de quitosano entrecruzado con glutaraldehído gel (derecha) y liofilizado (izquierda)

ANEXO N°3

C.1 Imágenes y cálculos de la cuaternización de quitosano con CTAG.



Imágenes de quitosano cuaternizado obtenido

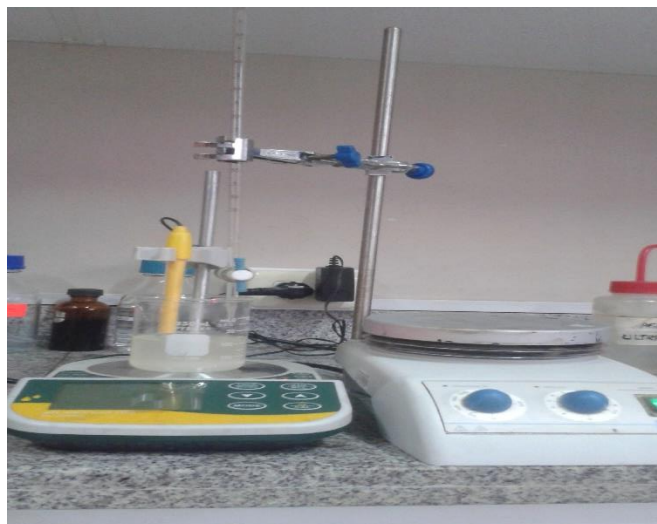


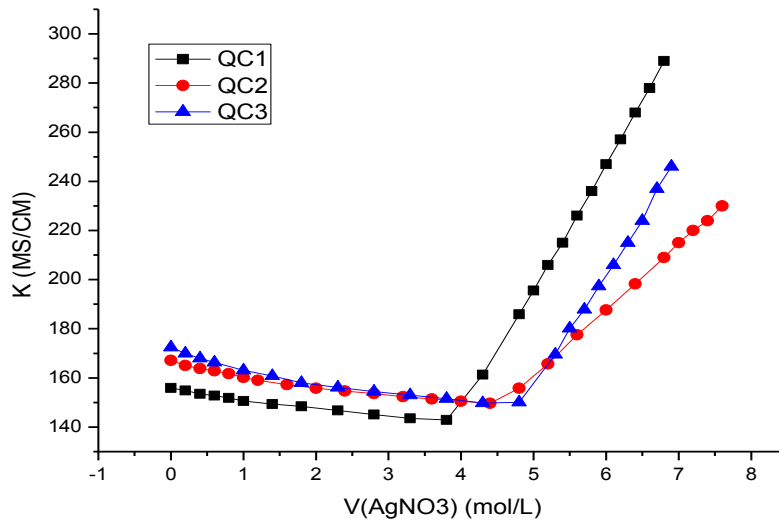
Imagen del sistema para determinar el grado de cuaternización

Valores de resultados de la titulación conductimétrica para los distintos quitosanos cuaternizados (QC1, QC2y QC3) con $\text{AgNO}_3=0.1\text{M}$

QC1		QC2		QC3	
V(AgNO3)	K	V(AgNO3)	K	V(AgNO3)	K
mL	MS/CM	mL	MS/CM	mL	MS/CM
0	155.9	0	167.1	0	172.5
0.2	154.9	0.2	165.1	0.2	170
0.4	153.5	0.4	163.8	0.4	168
0.6	152.8	0.6	162.9	0.6	166.3
0.8	151.9	0.8	161.7	1	163.1
1	150.6	1	160.2	1.4	160.8
1.4	149.4	1.2	159	1.8	158
1.8	148.4	1.6	157.3	2.3	156.1
2.3	146.8	2	155.8	2.8	154.4
2.8	145.1	2.4	154.7	3.3	153
3.3	143.5	2.8	153.6	3.8	151.5
3.8	142.9	3.2	152.4	4.3	149.8
4.3	161.3	3.6	151.4	4.8	150.1
4.8	185.9	4	150.5	5.3	169.5
5	195.6	4.4	149.7	5.5	180.2
5.2	206	4.8	155.8	5.7	187.9
5.4	215	5.2	165.7	5.9	197.3
5.6	226	5.6	177.6	6.1	206
5.8	236	6	187.6	6.3	215
6	247	6.4	198.3	6.5	224
6.2	257	6.8	209	6.7	237
6.4	268	7	215	6.9	246
6.6	278	7.2	220		
6.8	289	7.4	224		
		7.6	230		

Con estos valores de conductividad y $[\text{AgNO}_3]$ obtenidos se graficaron y se obtuvieron los grados de cuaternización de QC1, QC2 y QC3.

Gráficos de los datos obtenidos de la titulación conductimétrica de los distintos quitosanos cuaternizados.



Calculo numéricos del grado de cuaternización para QC1 (las medidas se hicieron por duplicado)

[Ag]=0.1M, V _(sol) =200mL		M(CTAG)=116g				
Sabemos: Eq (Ag)=Eq(Cl ⁻), también n(Cl ⁻)= n(AgNO ₃)=n(gru. Cuater)						
Muestra	V _(AgNO₃) -mL (volumen en el punto de inflexión de la gráfica)	[Cl ⁻] (ppm) (del QC1)	n _(gru. cuater) = n _(AgNO₃)	W _(gru. Cuat) (mg)	grado de cuater (mg/g)	Prom (mg QC/gQ)
QC1	3.94	0.069	0.394	45.666	227.98	228.56
QC1(d)	3.97	0.070	0.397	46.035	229.14	

Calculo numéricos del grado de cuaternización para QC2 (las medidas se hicieron por duplicado)

[Ag]=0.1M, V _(sol) =200mL		M(CTAG)=116g				
Sabemos: Eq (Ag)=Eq(Cl ⁻), también n(Cl ⁻)= n(AgNO ₃)=n(gru. Cuater)						
Muestra	V _(AgNO₃) –mL (volumen en el punto de inflexión de la gráfica)	[Cl ⁻] (ppm) (del QC1)	n _(gru. cuater) = n _(AgNO₃)	W _(gru. Cuat) (mg)	grado de cuater (mg/g)	Prom (mg QC/gQ)
QC2	4.50	0.079	0.45	52.167	248.41	242.70
QC2(d)	4.13	0.073	0.41	47.871	236.99	

Calculo numéricos del grado de cuaternización para QC3 (las medidas se hicieron por duplicado)

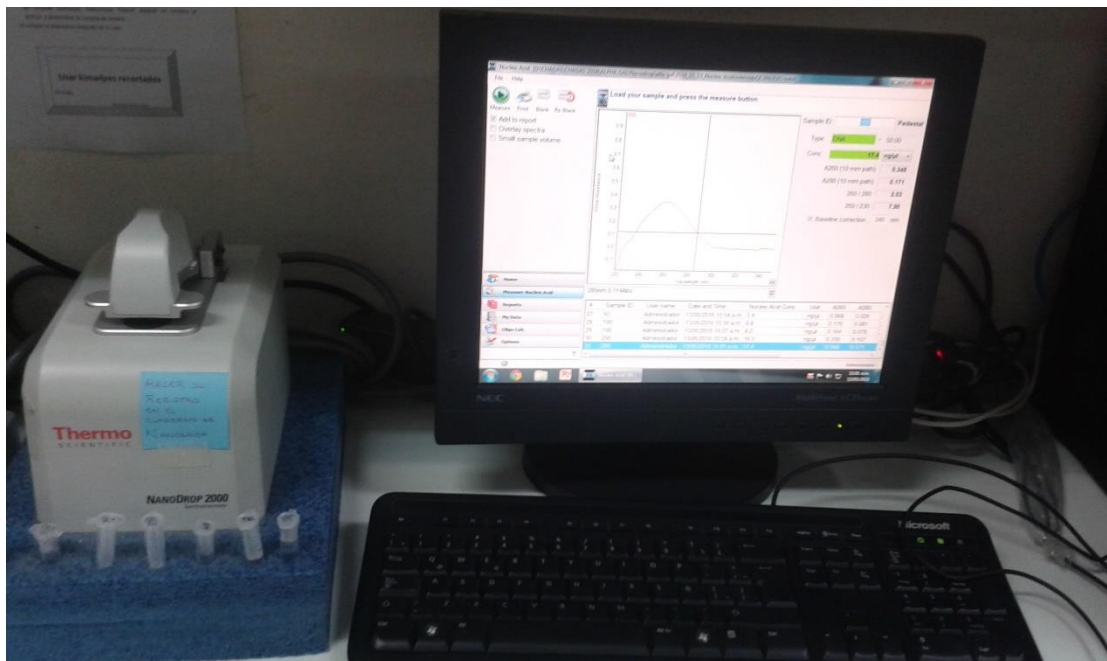
[Ag]=0.1M, V _(sol) =200mL		M(CTAG)=116g				
Sabemos: Eq (Ag)=Eq(Cl ⁻), también n(Cl ⁻)= n(AgNO ₃)=n(gru. Cuater)						
Muestra	V _(AgNO₃) –mL (volumen en el punto de inflexión de la gráfica)	[Cl ⁻] (ppm) (del QC1)	n _(gru. cuater) = n _(AgNO₃)	W _(gru. Cuat) (mg)	grado de cuater (mg/g)	Prom (mg QC/gQ)
QC3	4.75	0.084	0.47	52.167	274.89	268.44
QC3(d)	4.53	0.080	0.45	47.871	261.99	

ANEXO N°4

D.1 Imágenes, datos y cálculos de las isothermas de adsorción de ADN.

Para la construcción de las isothermas se partió de soluciones con concentraciones diferentes de ADN: 2, 5, 10, 20, 40, 80, 100, 200 y 400 ng/uL. En todas las disoluciones, se trabajó a un pH ≈ 7 , una vez transcurrido el tiempo de contacto (30min agitación y 30 min de centrifugación) se analizó la concentración de la fase líquida en el equilibrio (C_f) y la dosis de adsorbente (equipo UV-NaNodrop 2000), luego se calculó el valor de q_e con lo que se pudieron obtener las isothermas correspondientes.

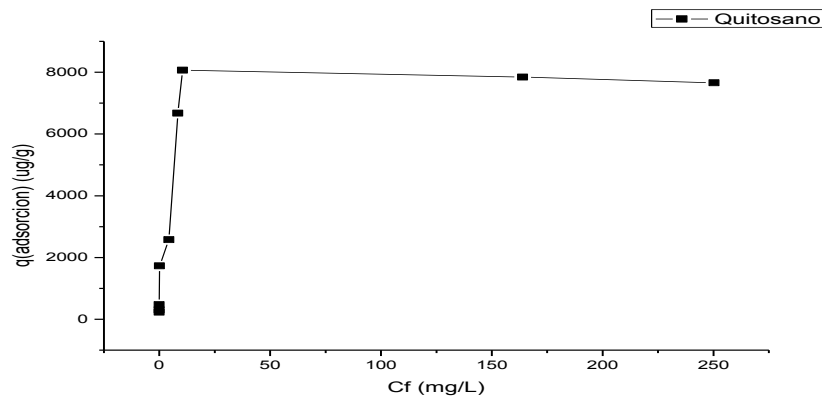
La imagen nos muestra el equipo utilizado en la determinación de la concentración de ADN (NanoDrop 2000-Univ. Cayetano Herdia)



Datos obtenidos en la construcción de la isoterma de adsorción para quitosano

QUITOSANO-ISOTERMA				
Adsorbente: W (quitosano)= 3mg			Adsorbato: ADN	
MUESTRA	[ADN] _o	[ADN] _f	[ADN] _f - [MP] _f	[ADN] _f (sin inter)
BK (medio)	-0.1	0.13	0.13	0.13
BK-MP	-0.1	6.4	0	0
1	2.15	5.2	-1.33	-1.33
2	3.15	5.15	-1.38	-1.38
3	5.15	4.6	-1.93	-1.93
4	26.05	6.65	0.12	0.12
5	43	8.65	4.35	4.35
6	108.55	12.7	8.4	8.4
7	131.55	14.8	10.5	10.5
8	181.95	68.6	64.3	64.3
9	365.15	255.5	250.3	250.3

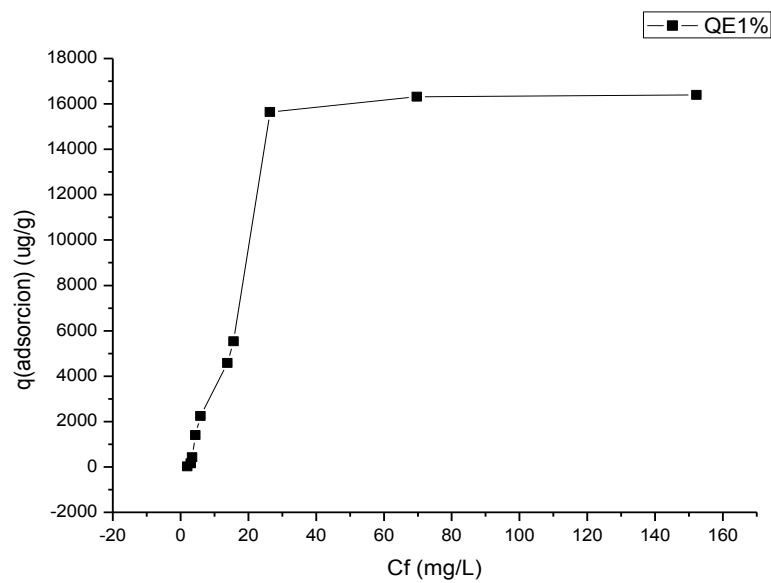
Grafica de la isoterma de adsorción de ADN para el quitosano, obtenido con los datos correspondientes a la tabla anterior.



Datos obtenidos en la construcción de la isoterma de adsorción para QE1%

QE1%-ISOTERMA				
Adsorbente: W (QE1%)=3 mg			Adsorbato: ADN	
MUESTRA	[ADN] _o	[ADN] _f	[ADN] _f - [MP] _f	[ADN] _f (sin inter)
BK (medio)	0.3	0.3	0.3	0.3
BK-MP	-0.1	12.15	0	0
1	2.3	14.45	2	-1.33
2	6	17.45	5	-1.38
3	9.8	15.9	3.45	-1.93
4	25.4	16.85	4.4	0.12
5	26.5	17.05	4.6	4.35
6	82.5	26.3	13.85	8.4
7	98.6	28.1	15.65	10.5

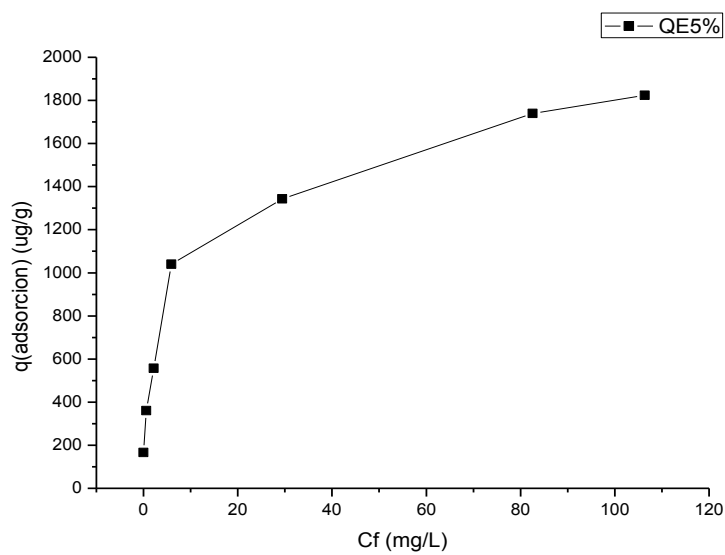
Grafica de la isoterma de adsorción de ADN para QE1%, obtenido con los datos correspondientes a la tabla anterior.



Datos obtenidos en la construcción de la isoterma de adsorción para QE5%

QE5%-ISOTERMA				
Adsorbente: W (QE5%)= 3mg			Adsorbato: ADN	
MUESTRA	[ADN] _o	[ADN] _f	[ADN] _f - [MP] _f	[ADN] _f (sin inter)
BK (medio)	0.2	-0.1	-01	-0.1
BK-MP	0.75	25.5	0	0
1	2.5	22.55	0	0
2	6	26.1	0.6	0.6
3	10.5	27.65	2.15	2.15
4	21.5	31.4	5.9	5.9
5	49.6	58.1	29.45	29.45
6	108.65	111.2	82.55	82.55
7	133.7	135	106.35	106.35

Grafica de la isoterma de adsorción de ADN para QE5%, obtenido con los datos correspondientes a la tabla anterior.



Datos obtenidos en la construcción de la isoterma de adsorción para QC3

QC3-ISOTERMA				
Adsorbente: W (QC3)=25mg			Adsorbato: ADN	
MUESTRA	[ADN] _o	[ADN] _f	[ADN] _f - [MP] _f	[ADN] _f (sin inter)
BK (medio)	0.2	-0.1	0	0
BK-MP	0.25	14.85	0	0
1	2.35	16.5	1.65	1.65
2	2.7	17.25	2.4	2.4
3	5.95	20.33	5.48	5.48
4	13.6	22.85	8	8
5	14.1	27.07	12.22	12.22
6	26.8	40.8	25.95	25.95
7	55.4	34	19.15	19.15

Grafica de la isoterma de adsorción de ADN para QC3, obtenido con los datos correspondientes a la tabla anterior.

