



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo A.C.**

**Propiedades Funcionales Básicas de Materiales  
Porosos Nanoestructurados de Quitosano**

---

POR:

GONZALO SANTOS LÓPEZ

TESIS APROBADA POR LA

Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Gonzalo Santos López, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



---

Dr. Jaime Lizardi Mendoza  
Director de Tesis



---

Dr. Waldo M. Argüelles Monal  
Asesor



---

Dra. Elizabeth Carvajal Millán  
Asesor



---

Dra. Maricarmen Thalía Recillas Mota  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACYT por becar mis estudios de maestría en ciencias.

Al Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por permitirme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Jaime Lizardi Mendoza director de tesis, por su apoyo incondicional en cada momento y en la formación profesional y humana.

Al comité de tesis Dr. Waldo M. Argüelles Monal, Dra. Elizabeth Carvajal Millán y la Dra. Maricarmen Thalía Recillas Mota, por su aportación y apoyo en la realización de esta tesis.

A la Dra. Ana María Calderón, su apoyo me ha permitido conocer, disfrutar y enamorarme de la investigación y del CIAD, muchas gracias.

A la Q.B. Alma Consuelo Campa Mada y a la M.C. Karla Guadalupe Martínez Robinson, por su apoyo técnico pero ante todo mi gran apreciación por compartir su amistad.

A la M.C. Alma Rosa Toledo Guillén por su asesoramiento en laboratorio, a cada uno de los compañeros de laboratorio Damián, Marco Antonio, Aarón, Jorge Márquez y Ana Luisa Martínez.

A la M.C. María Elena Lugo Sánchez del laboratorio de productos marinos del Centro de Investigación de Alimentación y Desarrollo, al Dr. Manuel Pérez Tello de la Universidad de Sonora, a la Dra. Amelia Olivas Sarabia del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM, por el apoyo brindado en la elaboración de esta tesis.

Un agradecimiento muy especial a Fernanda Patricia Saad Celis por el cariño que me ha regalado, por ayudarme a ser una mejor persona y la alegría que me da conocerla.

Agradezco a mi familia que es mi fortaleza y deseo de superación, gracias a ellos tengo la oportunidad de seguir mis sueños.

## **DEDICATORIA**

Le dedico esta tesis a mi familia, mis papás: Gonzalo y Virginia, a mis hermanos: Julio, David, Marco Antonio, Jonathan y Joshua.

Gracias por formar parte de mi vida.

## ÍNDICE

Aprobación .....	ii
Declaración Institucional.....	iii
Agradecimientos .....	iv
Dedicatoria .....	v
Índice .....	vi
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	ix
Resumen .....	x
Abstract .....	xi
Introducción .....	1
Marco Teórico.....	3
Qitosano.....	3
Proceso de Obtención .....	4
Características Fisicoquímicas .....	6
Propiedades funcionales .....	9
Materiales Porosos Nanoestructurados .....	17
Objetivos.....	20
Objetivo General .....	20
Objetivos Particulares .....	20
Materiales y Métodos.....	21
Materiales .....	21
Qitosano .....	21

Reactivos.....	21
Métodos .....	21
Sistemas de disolución de quitosano .....	21
Formación de hidrogeles .....	23
Formación de materiales porosos nanoestructurados.....	24
Caracterización de materiales porosos nanoestructurados.....	24
Propiedades Funcionales .....	25
Resultados y Discusión .....	29
Soluciones de Quitosano .....	29
Producción de Materiales Porosos Nanoestructurados .....	31
Estructuras Hidratadas de Quitosano.....	31
Aerogeles .....	32
Composición Química.....	33
Análisis Termogravimétrico.....	33
Análisis Estructural.....	35
Área Superficial Específica y Volumen de Poro .....	37
Estudios de Hinchamiento de Aerogeles .....	39
Grado de Hinchamiento.....	39
Coeficientes de Difusión y Energías de Activación.....	42
Estudios de Absorción .....	44
Adsorción de Proteína .....	44
Retención de Actividad de Enzima Inmovilizada .....	45
Conclusiones .....	46
Bibliografía.....	47

## Lista de Figuras

Figura 1. Estructura química del quitosano.....	3
Figura 2. Morfología de aerogeles de quitosano obtenidas a partir de solución en HAc (A) y en FBS (B). .....	19
Figura 3. Estimación de la $[\eta]$ de Qs en HAc-HCl y FBS. Los puntos representados en cuadrado, rombo y círculo corresponden a los datos calculados por las ecuaciones de Huggins, Punto Único y Kraemer, respectivamente. Las correspondientes líneas son el ajuste a los modelos teóricos que indican el valor de $[\eta]$ cuando $C=0$ . .....	30
Figura 4. Hidrogeles de quitosano formados de los sistemas de QsHAc, QsHCl y QsFBS respectivamente de izquierda a derecha. ....	31
Figura 5. Materiales porosos nanoestructurados (aerogeles) de quitosano. De izquierda a derecha: AQsHAc, AQsCl y AQsFBS. ....	33
Figura 6. Espectros de FTIR de quitosano en polvo (A) y los aerogeles de AQsFBS (B), AQsHAc (C) y AQsCl (D). ....	34
Figura 7. Curvas de TG de Qs en polvo (QsPrimex) y los aerogeles AQsFBS, AQsHAc y AQsHCl. ....	34
Figura 8. Imágenes de SEM a distintas ampliaciones de aerogeles AQsHAc. ....	35
Figura 9. Imágenes de SEM a distintas ampliaciones de aerogeles AQsHCl. ....	36
Figura 10. Imágenes de SEM a distintas ampliaciones de aerogeles AQsHAc. ....	36
Figura 11. Isotermas BET de adsorción y desorción de $N_2$ de aerogeles de A)AQsHAc, B)AQsHCl y C)AQsFBS. ....	38
Figura 12. Distribución de tamaño de poros de aerogeles de A)AQsHAc, B)AQsHCl y C)AQsFBS. ....	39
Figura 13. Hinchamiento en agua de AQsHAc a diferentes temperaturas.....	40
Figura 14. Hinchamiento en agua de AQsHCl a diferentes temperaturas. ....	40
Figura 15. Hinchamiento en agua de AQsFBS a diferentes temperaturas. ....	41
Figura 16. Dependencia de los coeficientes de difusión aparente de agua con la temperatura para los distintos aerogeles. A) AQsHAc, B) AQsHCl y C) AQsFBS. ....	43
Figura 17. Cinética de eficiencia de carga (EC) de albumina de suero bovino en aerogeles de AQsHAc, AQsHCl y AQsFBS. ....	44



## Lista de Tablas

Tabla 1. Reducción de volumen en la preparación de aerogeles de Qs.....	32
Tabla 2. Área superficial específica ( $S_{\text{BET}}$ ), el volumen total de poro ( $V_p$ ), tamaño de poro promedio ( $T_p$ ) de aerogeles de quitosano.....	38
Tabla 3. Parámetros de hinchamiento en agua de distintos aerogeles de Qs.....	42
Tabla 4. Coeficientes de difusión aparente, energías de activación aparente y de los distintos aerogeles de quitosano.....	43
Tabla 5. Retención de actividad de enzima inmovilizada en aerogeles de quitosano ..	45

## RESUMEN

El quitosano (Qs) es un polisacárido considerado atractivo por sus características fisicoquímicas y propiedades funcionales. Recientemente se ha empleado para generar materiales porosos nanoestructurados nombrados aerogeles. Se ha visto que dependiendo del solvente utilizado para solubilizar el Qs y manteniendo las mismas condiciones de proceso, se generan aerogeles con características estructurales diferentes. Es por esto que para estudiar el efecto del tipo de estructura se han evaluado las propiedades funcionales básicas de aerogeles provenientes de distintas soluciones de quitosano. Se utilizaron tres diferentes sistemas solventes para disolver el quitosano, ácido acético 0.3 M (HAc), ácido clorhídrico en concentración estequiométrica para la protonación del quitosano (HCl) y formaldehído bisulfito de sodio (FBS). De estas soluciones se formaron geles físicos que fueron secados con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico para la formación de tres tipos de aerogeles (AQsHAc, AQsHCl y AQsFBS). Los aerogeles se caracterizaron por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier y termogravimetría. Se observaron los mismos patrones del Qs del cual provienen descartando así posibles derivatizaciones durante el proceso. La morfología de los aerogeles de AQsHAc y AQsHCl presentó estructuras aglomeradas y el AQsFBS filamentosas. Aerogeles de AQsHAc y AQsHCl mostraron un patrón de hinchamiento similar a diferentes temperaturas, alcanzando su máximo ( $W_{eq} = 2.4-4.5$ ) a los pocos minutos. Los AQsFBS en cambio le tomó horas alcanzar su máximo hinchamiento. Se observó una mayor dependencia de la difusión de agua a temperaturas por encima de los 40 °C. Se evaluó la capacidad de adsorción de albúmina de suero bovino en los distintos aerogeles, que lograron cargas máximas sobre los 340 mg BSA / g aerogel en tiempos de adsorción similares (50 h). Los aerogeles AQsHCl mostraron mayor eficiencia en la retención de actividad de proteasa tipo XIV de *Streptomyces Griseus* (18.3 %), aunque los otros tipos de aerogel mostraron con un comportamiento similar. Los aerogeles se sometieron a un proceso de derivatización química, sin embargo no se lograron observar cambios significativos en su composición química.

**Palabras clave:** quitosano, sistemas solventes, materiales porosos nanoestructurados y propiedades funcionales.

## ABSTRACT

Chitosan (Qs) is a polysaccharide considered attractive by their physicochemical characteristics and functional properties. Recently it has been employed to generate nanostructured porous materials known as aerogels. It has been found that the structural characteristic of the obtained aerogels will vary depending on the solvent system of the Qs solution, providing that the process conditions are the same. In order to study the effect the aerogels structure, the basic functional properties of different chitosan aerogels were assessed. Three different solvent systems were used to dissolve chitosan, acetic acid 0.3 M (HAc), hydrochloric acid in stoichiometric concentration for protonation of chitosan (HCl) and formaldehyde sodium bisulfite (FBS). Physical gels were formed from different chitosan solutions and these were dried by supercritical CO<sub>2</sub> to form three different types of aerogels (AQsHAc, AQsFBS and AQsHCl). The obtained aerogels were analyzed by Fourier transformed infrared spectroscopy and thermogravimetry; no differences with original Qs discarding the possible derivatizations through the process. The morphology of AQsHCl and AQsHAc aerogels appear as agglomerated structures, conversely the AQsFBS is filamentous. Aerogels from acid Qs solutions showed similar swelling pattern at different temperatures, reaching its maximum ( $W_{eq} = 2.4-4.5$ ) within few minutes. The AQsFBS aerogels reach their maximum swelling in hours. A higher dependence of the water diffusion was observed for temperatures above 40 °C. The protein adsorption capacity of the aerogels was evaluated using bovine serum albumin. All the aerogels reach maximum loadings over 340 mg BSA / g aerogel at similar adsorption times (50 h). The AQsHCl aerogels showed greater protease (*Streptomyces griseus* type XIV) activity retention (18.3%), however the other aerogels shown similar behavior. The aerogels were subjected to a chemical derivatization procedure, but no change on the chemical composition was observed.

**Keywords:** Chitosan, solvent system, nanostructured porous materials and functional properties

## INTRODUCCIÓN

El quitosano (Qs), un polisacárido natural que ha despertado gran interés en diversas áreas como la biomedicina, farmacéutica, agricultura, ciencia y tecnología de alimentos, ingeniería ambiental, etc. Buena parte de su atractivo radica en un conjunto de propiedades funcionales peculiares entre las que destacan que es el único biopolímero con carácter policatiónico, es biocompatible, biodegradable, presenta actividad fitoestimulante, antifúngica, bacteriostática, hemostática y mucoadhesividad, adsorbe proteínas, lípidos y metales, entre otras. Por otra parte, gran cantidad de aplicaciones del quitosano dependen de su capacidad de formar diversos materiales con un rango amplio de cualidades mecánicas como son: películas, fibras, geles o estructuras porosas.

De forma general, el uso de estructuras porosas de quitosano puede clasificarse en tres grupos principales: como material para absorción de distintas sustancias como lípidos, proteínas, pigmentos o metales; formando parte de sistemas de liberación controlada de fármacos y como andamiajes para soporte o inmovilización de catalizadores o células. Al igual que en el caso de otros polisacáridos, las estructuras porosas de quitosano son generalmente obtenidas a partir de diferentes procesos de secado o mediante el uso de porógenos. Por ejemplo, un proceso comúnmente utilizado es la liofilización. Este proceso ha sido ampliamente estudiado y controlando tanto las condiciones de congelado como de sublimación es posible modificar en cierta medida el tamaño y morfología de la estructura porosa formada. Sin embargo, los procesos de liofilización típicamente generan estructuras macroporosas. Otro proceso que se ha aplicado a diferentes matrices poliméricas es el secado supercrítico con CO<sub>2</sub> por medio del cual se han logrado generar materiales porosos nanoestructurados, mejor conocidos como aerogeles; a diferencia de otros procesos éste logra generar materiales mesoporosos.

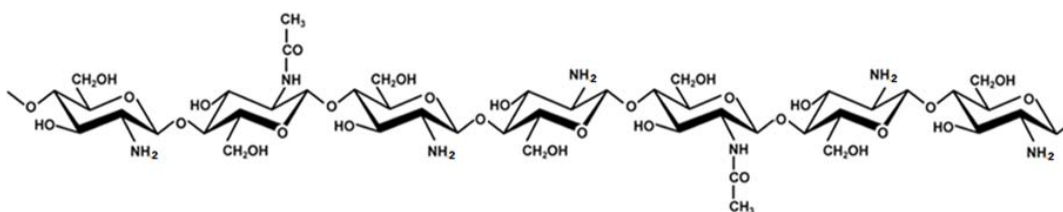
contexto de ingeniería de tejidos o sistemas de liberación controlada de fármacos. Como parte de la investigación desarrollada por el Grupo de Biopolímeros de CIAD se ha observado que dependiendo del tipo de sistema solvente utilizado para disolver el quitosano y manteniendo un mismo proceso de elaboración del material, se obtienen aerogeles con diferente morfología estructural. Esto se ha explicado en función de la conformación molecular del quitosano en los distintos sistemas solventes así como su relación con los procesos de dispersión y coacervación durante la formación de la estructura del gel.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, se considera que las propiedades funcionales básicas de aerogeles de quitosano serán afectadas por su estructura. De esta forma, un mismo lote de quitosano disuelto en distintos sistemas solventes, en ácido diluido y en una solución acuosa de bisulfito sódico de formaldehído, podría generar estructuras porosas nanoestructuradas con propiedades distinguibles. Es por esto que se plantea evaluar las propiedades funcionales básicas de tres tipos distintos de aerogeles de quitosano obtenidos mediante tratamiento de secado supercrítico con CO<sub>2</sub> de geles físicos.

## MARCO TEÓRICO

### Quitosano

El quitosano (Qs) es un término generalmente aplicado al polisacárido producto de la desacetilación de la quitina, aunque no solamente se obtiene de este proceso, también es posible encontrarlo en forma natural en algunos hongos formando parte de la pared celular [1]. Su estructura química está formada por unidades de 2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranososa (D-glucosamina) y 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa (N-acetilglucosamina) unidas de forma lineal mediante enlaces  $\beta(1-4)$  a lo largo de la cadena polimérica (Figura 1). En el quitosano la unidad D-glucosamina se encuentra en mayor proporción a lo largo de su cadena. Al igual que ocurre con la quitina, el término quitosano no se refiere a una molécula con características químicas estrictamente definidas, si no que, debido a variabilidad inherente a su origen y proceso, comprende moléculas con un amplio intervalo de valores de pesos moleculares, grado de acetilación y patrón de distribución de las unidades que lo componen. Incluso puede considerarse que tanto la quitina como el quitosano forman una sola familia de polisacáridos que, en función de sus características fisicoquímicas particulares, presentan una gran variedad de propiedades funcionales.



**Figura 1.** Estructura química del quitosano.

Una de las principales diferencias entre quitina y quitosano es su solubilidad. La quitina es insoluble en agua y solventes orgánicos comunes. Existen contados sistemas solventes reportados para disolverla, entre los que se encuentra el propuesto por Sannan y colaboradores, en donde utilizan hidróxido de sodio (NaOH) a altas concentraciones, tratamiento al vacío y bajas temperaturas; así como el método propuesto por Austin que involucra el uso de una mezcla de N,N-dimetilacetamida y cloruro de litio [2; 3]. A diferencia de la quitina, el quitosano tiene un espectro más amplio de solventes que se pueden utilizar para formar soluciones verdaderas. La forma más común de disolver el quitosano es por medio de soluciones ácidas acuosas. En este medio los grupos amino (-NH<sub>2</sub>) de las unidades D-glucosamina sufren una protonación haciendo al polisacárido un polielectrolito soluble. Esta característica lo hace el único polímero policationico natural [4].

### **Proceso de Obtención**

El quitosano es un polisacárido que puede encontrarse como tal en la naturaleza, principalmente en algunas especies de hongos del filo Zygomycota, por ejemplo, especies del género *Absidia*, *Mucor*, o *Rhizopus*. En estos organismos el quitosano forma parte estructural de su pared celular impartándole rigidez. La obtención de quitosano por medio de cultivo de microorganismos ha despertado considerable interés debido al control de producción que se puede lograr empleando técnicas biotecnológicas [1; 5; 6]. Sin embargo, hasta el momento la obtención de este biopolímero a nivel industrial se da mediante la desacetilación termoquímica de la quitina. Las principales fuentes de las que se obtiene quitina son los desechos del procesado comercial de crustáceos y moluscos como camarones, cangrejos, langostinos y calamar [7; 8].

La composición, en base seca, de caparazones de crustáceos está dada típicamente por un 13-58% de proteína, de un 20-72% de sales minerales, de 1-12% de lípidos y de un 14-35% de quitina [9]. De manera que para obtener quitosano, primero hay que aislar la quitina de los otros componentes de la matriz en la que se encuentra. De forma general, este proceso se da en tres operaciones, que incluyen un proceso de desproteínización, otro de

desmineralización o remoción de minerales y la separación de lípidos y pigmentos.

Típicamente la quitina está formada casi en su totalidad por unidades de N-acetil-D-glucosamina, por lo que se necesita desacetilar estos grupos funcionales para poder obtener quitosano. Normalmente la desacetilación de la quitina requiere de condiciones de reacción muy severas, que incluyen altas concentraciones de álcali y temperaturas elevadas. Algunas razones para esto son: el denso empaquetamiento de las cadenas en el enrejado cristalino de la quitina, que previene la difusión del álcali a los sitios reactivos; la presencia de numerosos enlaces de hidrógeno entre grupos carbonilo y amida de cadenas de polisacárido adyacentes; así como la baja reactividad debida a la configuración *trans* de los sustituyentes acetamida con respecto al grupo hidroxilo (OH) en la posición 3 del anillo piranósico de la unidad monomérica [9]. De esta manera, la reacción de desacetilación tiende a iniciar y darse de manera más completa en las regiones amorfas de las partículas de quitina [10].

Entre los procesos de desacetilación de quitina reportados pueden distinguirse dos tipos de metodologías: Las reacciones en fase heterogénea y las que se dan en condiciones homogéneas. Esta clasificación se refiere a la forma en que se da la reacción, así en la desacetilación heterogénea la reacción ocurre en la interface de las partículas de quitina (sólido, p. ej. hojuelas) y el medio de reacción (líquido). En cambio en la desacetilación homogénea las moléculas se encuentran disueltas o formando una suspensión coloidal en el medio de reacción de manera que la reacción ocurre de manera aleatoria sobre cualquier molécula de quitina.

La desacetilación termoalcalina heterogénea es el tipo de proceso más comúnmente utilizado. Generalmente se lleva a cabo utilizando altas concentraciones (20-50%) de hidróxido de sodio (NaOH) a temperaturas alrededor de los 100 °C durante tiempos de reacción de decenas de minutos a varias horas. Este tipo de procesos tienden a tener amplia variabilidad en los resultados del grado de acetilación y peso molecular del quitosano obtenido. Dicha variabilidad ha sido relacionada con las condiciones particulares del proceso, tiempo y temperatura de reacción, tratamientos previos de la materia prima, la calidad de los reactivos, el tamaño de partícula, densidad de la quitina, la relación en la mezcla de reactivos, velocidad y tipo de agitación, entre otras [9; 10].



Por su parte, la desacetilación homogénea requiere que la estructura nativa de la quitina se deshaga para obtener una suspensión coloidal de moléculas de quitina. Esto normalmente se logra mediante procesos de hinchamiento y la posterior disolución de la quitina en soluciones acuosas de hidróxido de sodio empleando bajas temperaturas o ciclos de congelado y descongelado. Una vez obtenida la suspensión de quitina la desacetilación se logra a temperaturas cercanas al ambiente por largos periodos de tiempo. Esto hace que la desacetilación bajo condiciones homogéneas tenga lugar aleatoriamente a lo largo de la cadena. Como resultado las moléculas del quitosano obtenido presentan una distribución aleatoria de unidades D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina lo que favorece su solubilidad [2; 9-11].

Los métodos termoalcalinos que se utilizan para obtener quitosano generan productos con una amplia distribución de pesos moleculares y de grados de acetilación. Sin embargo, algunas aplicaciones biomédicas requieren materiales con la mayor uniformidad de propiedades físicas y químicas posible. Una forma de lograr esto es mediante procesos controlables usando la desacetilación enzimática de sustratos quitinosos. Se han registrado diversos esfuerzos para utilizar quitina desacetilasas, las cuales se han aislado y purificado de varios tipos de hongos, que incluyen *Mucor rouxii*, *Aspergillus nidulans*, *Lentinula edodes*, entre otros. La principal limitante al uso de este tipo de enzimas es que no resultan muy efectivas para desacetilar sustratos de quitina insolubles y, por lo tanto, es necesario un pretratamiento de los sustratos cristalinos de quitina que favorezcan la accesibilidad de los grupos acetamida a la enzima [9; 12].

### **Características Fisicoquímicas**

Tanto la composición de las cadenas de quitosano, como sus dimensiones, varían dependiendo tanto de las características del material del que se obtienen como del método utilizado. Esto se ve reflejado en la variabilidad de grados de acetilación y la distribución de masas moleculares en una muestra; es por esto que el quitosano es polidisperso. Otras características, como el contenido de humedad, la solubilidad, pureza o el contenido de proteínas, son importantes determinarlas en el quitosano para conocer cual pudiera ser su aplicación [13].

A continuación se hace una descripción de las principales características fisicoquímicas del quitosano.

Grado de Acetilación. La quitina y el quitosano son una familia de polisacáridos, la diferencia principal la marca el grado de acetilación de cada compuesto. Cuando la proporción de unidades de N-acetil-D-glucosamina es mayor al ~40% con respecto a las unidades de D-glucosamina se dice que se está en presencia de quitina; en el caso contrario, cuando es menor, se está en presencia de quitosano. A la proporción de unidades acetiladas respecto al número total de unidades que forman la molécula de polímero se le conoce como grado de acetilación (GA). Otra forma de expresarlo es como grado de desacetilación (GD) que es complementario al GA pero expresa la proporción de unidades glucosamina respecto al total de unidades en la cadena polimérica. La diferencia entre los grupos aminos en la quitina y quitosano tiene efectos marcados en diversas propiedades de la molécula, particularmente influye en la solubilidad, cristalinidad, biodegradabilidad, viscosidad, biocompatibilidad, capacidad antimicrobiana y otros [14].

Dada la influencia del GA sobre las propiedades del quitosano resulta necesario realizar una determinación precisa de este parámetro. Existen diferentes métodos que se han desarrollado para determinar el GA de un quitosano. Los métodos absolutos se consideran así porque no necesitan de calibración para determinar el GA. Un ejemplo de esto es la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), el cual es un método no invasivo para el estudio de las características químicas y estructurales de los polisacáridos. En principio, tanto la espectroscopía de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se utilizan para estimar el GA de muestras de quitosano en solución, aunque la espectroscopía de  $^{13}\text{C}$  se utiliza también para muestras sólidas, aunque necesita de aditamentos especiales para mejorar la resolución y sensibilidad [12; 13].

Otra forma para determinar el GA es mediante la espectroscopía de infrarrojo, la cual es una técnica comúnmente empleada por su sencillez. La metodología para determinar el GA consiste en correlacionar la relación de absorbancias entre dos bandas de absorción determinadas, con la proporción de unidades acetiladas del quitosano. Normalmente estas bandas involucran una señal dependiente del grado de acetilación y una de referencia interna para

corregir las diferencias de grosor de películas o de concentración de las pastillas de KBr. Brugnerotto y colaboradores analizaron 25 muestras de quitina y quitosano de diferentes fuentes y GA determinados por espectroscopía de RMN en donde tomaron como banda característica a la localizada a los  $1320\text{ cm}^{-1}$ , y como referencia la banda a  $1420\text{ cm}^{-1}$ , obteniendo una correlación lineal de ( $r=0.99$ ) expresada en la Ecuación 1 [15].

$$\text{Ecuación 1. DA (\%)} = 31.92 \times (A_{1320}/A_{1420}) - 12.20$$

Existen otras técnicas para determinar el GA de quitosano como la espectroscopía ultravioleta, la valoración conductimétrica y potenciométrica, la cromatografía de HPLC, estos métodos se caracterizan por utilizar soluciones de quitosano para las determinaciones del GA [16-18].

Peso Molecular. El grado de acetilación y el peso molecular son dos de los parámetros principales que influyen en las propiedades funcionales del quitosano. Su polidispersión se refleja en la variabilidad de pesos moleculares que se pueden encontrar en una muestra de quitosano. Ante la dificultad para analizar cada molécula en una muestra se emplean técnicas que estiman promedios estadísticos del peso molecular. Entre los diferentes pesos moleculares promedio que se pueden determinar se encuentran: el peso molecular promedio en número ( $M_n$ ) que se determina por osmometría de membranas, el peso molecular promedio en peso ( $M_w$ ) determinado por la técnica de dispersión de luz, por medio de viscosimetría se obtiene el peso molecular viscosimétrico ( $M_v$ ) y por medio de sedimentación por ultracentrifugación es posible obtener el peso molecular promedio Z ( $M_z$ ) y el peso molecular promedio Z+1 ( $M_{z+1}$ ) [19; 20].

Las dos técnicas más utilizadas para la determinación de pesos moleculares de quitosano son la viscosimetría y la dispersión de luz. La determinación de peso molecular promedio viscosimétrico se basa en la obtención de la viscosidad intrínseca  $[\eta]$ . Este parámetro se relaciona con  $M_v$  mediante la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (MHS) (Ecuación 2)

$$\text{Ecuación 2. } [\eta] = KM_v^a$$

Siendo  $K$  y  $\alpha$  dos constantes que dependen de la naturaleza del polímero, su relación con el sistema disolvente utilizado y la temperatura [4; 21].

El método de dispersión de luz permite medir la masa molecular dado que la cantidad de luz dispersada, DL, es directamente proporcional al producto del peso molecular promedio en peso,  $M_w$ , y la concentración del soluto ( $DL \sim M_w \cdot c$ ). Esta relación está descrita por el modelo de dispersión de luz de Rayleigh-Debye-Gans (Ecuación 3)

$$\text{Ecuación 3. } K^* \cdot c / R(\theta) = [1/M_w \cdot P(\theta)] + 2A_2 \cdot c$$

Donde:  $R(\theta)$  es el exceso de intensidad de la luz dispersada al ángulo  $\theta$ , 'c' es la concentración de la muestra.  $M_w$  es el peso molecular promedio en peso (masa molar).  $A_2$  es el segundo coeficiente del virial.  $K^*$  es un parámetro óptico igual a  $4\pi^2 n^2 (dn/dc)^2 / (\lambda_0^4 \cdot N_A)$ . El índice de refracción del solvente está indicado por  $n$  y  $dn/dc$  es la diferencial del índice de refracción.  $N_A$  es el número de Avogadro.  $\lambda_0$  es la longitud de onda (cm) de la dispersión de la luz en el vacío. La función  $P(\theta)$  describe la dependencia angular de la dispersión de la luz.

De la Ecuación 3 es posible calcular el  $M_w$ , la raíz cuadrada media del radio ( $\langle r_g^2 \rangle^{1/2}$ ) y el segundo coeficiente del virial ( $A_2$ ) que es una representación numérica de la interacción polímero solvente. Una forma de resolver la ecuación es por el método de Zimm construyendo una gráfica de  $K^*c / R(\theta)$  contra el  $\sin^2(\theta/2) + K^*c$  haciendo un doble ajuste a los datos por extrapolación obteniendo del  $M_w$  y el  $\langle r_g^2 \rangle^{1/2}$  del intercepto y la pendiente a ángulo cero y concentración cero. El método de dispersión de luz, a pesar de ser un método absoluto se ha aplicado poco para quitina y quitosano debido a los costos de los equipos y a la dificultad al interpretar los resultados cuando existe agregación o asociación [13; 22].

## Propiedades Funcionales

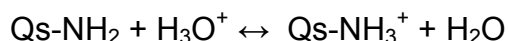
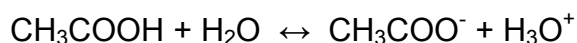
Las propiedades funcionales de los biopolímeros son finalmente determinadas por sus características moleculares, tales como su peso molecular, conformación, flexibilidad, polaridad, así como su capacidad de interacción con otras moléculas [23]. En el caso del quitosano su funcionalidad

está directamente relacionada con el grado de acetilación y el patrón de distribución de sus unidades a lo largo de la cadena. Así, por una parte sus unidades acetiladas pueden formar puentes de hidrogeno o interacciones hidrofóbicas, mientras las unidades desacetiladas pueden ser ionizadas en disolventes ácidos acuosos y transformar al quitosano en un polielectrolito catiónico, que es capaz de formar diversas interacciones con otros compuestos. Además la presencia de diversos grupos químicos susceptibles a modificaciones abre la posibilidad a modular la funcionalidad del quitosano.

**Solubilidad y Propiedades en Solución.** A diferencia de su precursor, la quitina, el quitosano tiene un mayor espectro de solventes en los que puede ser solubilizado. Al ser una base forma sales al interactuar con ácidos diluidos en medios acuosos, esto forma polielectrolitos cuya solubilidad está en función de la naturaleza del anión involucrado así como del grado de acetilación y peso molecular del quitosano. De esta manera el quitosano puede disolverse en ácidos inorgánicos diluidos como el clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, iodhídrico, nítrico y el perclórico. Sin embargo, si la concentración de estos ácidos es muy alta el quitosano tiende a precipitar. El quitosano tiende a formar sales solubles con ácidos orgánicos de bajo peso molecular, tales como el ácido acético, láctico, fórmico, así como también con ácidos mono y dicarboxílicos [7; 13].

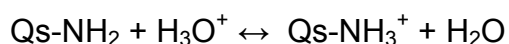
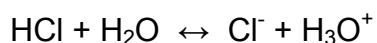
En ambientes ácidos diluidos las cadenas de Qs sufren una protonación de los grupos  $-NH_2$  en el carbono 2 de la unidad de D-glucosamina [4]. La solubilidad del quitosano se da debido a que las repulsiones electrostáticas de las cargas catiónicas formadas son más importantes que las interacciones de baja energía, como puentes de hidrógeno e hidrofóbicas, entre cadenas. Este proceso es favorecido principalmente por la hidratación de los sitios cargados. De esta manera, la densidad de carga del quitosano junto con el GA son dos de los principales parámetros fisicoquímicos que influyen en su solubilidad [24].

Uno de los solventes ácidos acuosos tradicionales y de mayor uso para disolver el Qs es el ácido acético (HAc), en donde se establece el siguiente equilibrio:



En esta disolución se ha observado que el grado de neutralización del Qs depende del pK del ácido [25]. El pK intrínseco,  $pK_0$ , es un parámetro que caracteriza el comportamiento polielectrolítico del quitosano, el cual se define como el valor de pK del polímero extrapolado a cero. Algunos estudios han mostrado que quitosano con GA de hasta 0.25 % presenta un  $pK_0$  de 6.5 cuando es disuelto en HAc [25]. También se ha demostrado que el quitosano requiere de un grado mínimo de 0.5 de protonación para disolverse. Esto hace que las interacciones electrostáticas predominen y el quitosano se vuelva un polielectrolito catiónico caracterizado por la expansión de sus cadenas [26].

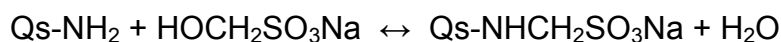
Otro solvente que se ha estudiado ampliamente en la disolución del quitosano es el HCl, el cual es un ácido fuerte y la reacción que tiene lugar es la siguiente:



En este sistema Qs-solvente se ha determinado un  $pK_0$  de 6.0 y un grado de protonación mínimo de 0.5 [27].

Existen otros parámetros que influyen en la solubilidad del quitosano, como la densidad y distribución de carga eléctrica, así como la fuerza iónica del medio. Por ejemplo, la presencia de iones en la solución pueden causar el apantallamiento de las cargas afectando el volumen hidrodinámico y la flexibilidad de la cadena en solución [28]. Debido a la protonación del quitosano a bajos pH se generan repulsiones electrostáticas intra e intermoleculares provocando la expansión de la cadena y dando lugar a grandes volúmenes hidrodinámicos que favorecen su solubilidad. Sin embargo, en presencia de grandes cantidades de iones, como el  $\text{Cl}^-$ , la viscosidad disminuye con el pH debido al apantallamiento electrostático de las cargas, aún cuando se mantiene la flexibilidad de las cadenas [22; 26]. Se han identificado tres dominios de comportamiento en solución respecto al GA del quitosano: cuando el GA está por debajo del 20% domina la expansión de las cadenas, a GA entre 20 y 50% los parámetros fisicoquímicos son más o menos constantes debido a que las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas se encuentran contrarrestadas la una a la otra y para GA por arriba de 50% las asociaciones de las cadenas llevan a la formación de agregados estables [22; 26].

Un solvente alternativo a los solventes ácidos acuosos diluidos de uso tradicional en el que es posible disolver el quitosano es la disolución de la sal compleja de formaldehído bisulfito de sodio (FBS). En solución, los grupos amino de las cadenas de Qs reaccionan con el FBS, formando un producto de condensación, que es un polielectrolito aniónico capaz de formar soluciones estables en agua a pH neutro [29; 30].



Las propiedades reológicas de las soluciones de quitosano son un factor importante para muchas de sus aplicaciones. Soluciones de quitosano a bajas concentraciones en el sistema solvente de HAc y cloruro de sodio (NaCl) han mostrado un comportamiento newtoniano, pero al incrementar la concentración de polisacárido aparece un comportamiento no newtoniano. Estudios reológicos indican que la viscosidad varía con el GA. La viscosidad, el flujo no newtoniano y la energía de activación de flujo ( $E_f$ ) tienden a incrementar cuando el GA disminuye. La presencia de sal disminuye la viscosidad y las propiedades de flujo no newtoniano pero sin cambios en la  $E_f$  de la solución. Debido a los fuertes enlaces de hidrógeno intermoleculares, sobre todo a bajas concentraciones, las macromoléculas de quitosano tienen la tendencia a enredarse y a formar redes. La densidad de los enredamientos moleculares en las soluciones de quitosano dependen de la concentración, temperatura y fuerza cortante aplicado [13; 22; 31; 32].

Una curva maestra de quitosano incluyendo el régimen diluido ( $c[\eta] \leq 4$ ), que describe la dependencia de la viscosidad específica  $\eta_{sp}$  sobre el parámetro de solapamiento  $c[\eta]$ , muestra dos zonas diferenciadas. Para condiciones menores a  $c[\eta] = 1.45$  y  $\eta_{sp} = 2.1$  se observa una pendiente de 1.16. En condiciones por arriba de los valores mencionados los resultados se desvían de la recta observada, lo que podría indicar incipientes contactos moleculares y el inicio de enredamientos topológicos. De esta forma puede identificarse la región de régimen diluido por debajo de la concentración crítica de solapamiento ( $C^*$ ) [13; 32; 33].

Reactividad. El quitosano ha sido objeto de diferentes modificaciones químicas, principalmente para cambiar sus propiedades y adecuar su funcionalidad en diversos campos. La derivatización química del quitosano puede realizarse

sobre todo por la presencia de grupos amino e hidroxilo susceptibles de modificación. Gran parte de las modificaciones se enfocan a introducir sustituyentes en los grupos amino. Algunas dificultades que se dan en su modificación se deben a la fortaleza de sus fuerzas moleculares y a la baja solubilidad en los solventes orgánicos comunes. Muchas de las reacciones del quitosano no son fáciles de controlar debido a que se realizan en condiciones heterogéneas. A consecuencia de esto se observan problemas como baja eficiencia de reacción, dificultad en la sustitución selectiva, poca uniformidad estructural en los productos, y degradación parcial debido a las condiciones severas de reacción, entre otras [34].

Entre las distintas reacciones que se han estudiado en el quitosano se encuentran las siguientes: N- y O-acilación, esta derivatización generalmente se realiza con anhídridos carboxílicos o cloruros de acilo formando productos solubles en agua [35]; N-ftaloilación, que se da reaccionando Qs con anhídrido ftálico, este producto puede ser soluble en solventes orgánicos polares apróticos [34]; tosilación con la introducción de grupos tosilato (*p*-toluensulfonilo), lo que mejora la afinidad con solventes orgánicos [36]. Otra reacción que ha sido estudiada es la condensación de los grupos amino del quitosano con aldehídos y cetonas para la formación de bases de Schiff, en donde el enlace imino (C=N) es estable en condiciones neutras y básicas pero se hidroliza en condiciones ácidas. La formación de las bases de Schiff pueden ser usadas para la protección de los grupos aminos del quitosano en la modificación química de los grupos hidroxilo remanentes [36]. A partir de las bases de Schiff se pueden generar nuevos compuestos mediante la reducción a grupos N-alquilo con borohidruro ( $\text{NaBH}_3$ ) o cianoborohidruro de sodio ( $\text{NaCNBH}_3$ ). También a partir de bases de Schiff de Qs se pueden formar sales cuaternarias por reacción en medio alcalino con yoduro de metilo [13].

Capacidad de Adsorción. La adsorción es un proceso en el que intervienen interacciones de baja intensidad como enlaces iónicos, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas. El quitosano tiene grupos funcionales que pueden generar estas interacciones con moléculas de diferentes tipos. La capacidad de adsorción del quitosano es dependiente de sus características fisicoquímicas, principalmente el GA y peso molecular. Las condiciones de contacto como pH, fuerza iónica, el tamaño de partícula,



porosidad del material, así como de los tipos y características del adsorbato tienen también influencia considerable en los procesos de adsorción [37].

Estudios de adsorción de quitosano enfocados a metales de transición han sido ampliamente documentados. Se considera que el quitosano es un buen adsorbente de iones metálicos. Esta propiedad implica la participación de los grupos OH- y O- de los residuos de D-glucosamina como ligandos y al menos 2 o más grupos amino de una misma cadena para unirse a un mismo ión metálico [38]. La interacción del quitosano con iones metálicos es un mecanismo complejo que implica la quelación, el intercambio iónico y la adsorción [39].

El quitosano ha sido utilizado también como material para adsorción de proteínas. Las interacciones que se generan entre el quitosano y las proteínas dependen de parámetros como el grado de protonación de los grupos amino en solución y la densidad de carga, los cuales son determinados por el GA, así como del pH y la fuerza iónica del medio. Debido a que las proteínas son moléculas cargadas, para que estas interactúen con el quitosano su punto isoelectrico debe ser inferior al pKa del quitosano, de forma que sus cargas sean opuestas. En este caso las interacciones suelen ser débiles y los fenómenos de desorción son frecuentes [40].

Estudios de adsorción de lípidos con quitosano han demostrado la dependencia del pH en la interacción de lípidos aniónicos con quitosano, influyendo también el GA, la cristalinidad del quitosano, en la cual un aumento del grado de cristalinidad aumenta la capacidad de adsorción del quitosano [41; 42].

Capacidad Estructural. El quitosano es un biopolímero de gran interés no solo por sus propiedades biológicas y químicas, sino también por sus propiedades mecánicas. El quitosano no tiene propiedades termoplásticas, pues se degrada a temperaturas menores que su transición vítrea. Es por esto que la mayoría de los procedimientos para generar materiales estructurados a partir de quitosano requieren que éste se encuentre en solución. Las propiedades de los materiales que pueden obtenerse dependen en gran parte de las características fisicoquímicas (peso molecular, GA, entre otras) del quitosano utilizado. El tipo y extensión de las interacciones que se forman están en función del tipo de solución que se utilice, la concentración, presencia de iones u otros compuestos

y las condiciones empleadas para obtener el cambio de fase. Como ejemplo, soluciones de quitosano con concentraciones por debajo de la concentración crítica ( $C^*$ ) generan agregados coloidales llegando incluso al rango de los nanómetros. En cambio, por encima de la  $C^*$ , se producen entrecruzamientos que proveen puntos de unión para formar estructuras hidratadas macroscópicas. De esta manera a partir de soluciones de Qs se han logrado obtener materiales muy diversos, entre los que se encuentran micro- y nanopartículas, fibras [43], películas y membranas [44], estructuras sólidas hidratadas (geles) [45], así como materiales porosos [46].

Dentro de los materiales más utilizados se encuentran los hidrogeles, que se definen como redes macromoleculares hidratadas caracterizadas por su comportamiento como sólido flexible pese a estar formado en su mayoría por un fluido [47]. De acuerdo con la naturaleza de las uniones que forman la red tridimensional que los constituye los geles se pueden clasificar en: físicos y químicos. En los geles físicos proliferan las uniones formadas por interacciones débiles, mientras que en los químicos los entrecruzamientos están formados por enlaces covalentes. En los geles químicos, además de los enlaces covalentes también pueden darse otras interacciones secundarias, como las hidrofóbicas y puentes de hidrogeno [13; 48]. Los hidrogeles de quitosano pueden ser obtenidos por diversos mecanismos de entrecruzamientos químicos o físicos. Pueden lograrse geles de quitosano con interacciones covalentes, por medio de un agente entrecruzante que logran reaccionar covalentemente distintas cadenas de quitosano, o bien con otros compuestos para formar estructuras híbridas, parcial o totalmente interpenetradas. Los hidrogeles formados por interacciones iónicas también se han servido de agentes entrecruzantes, pero de naturaleza aniónica, que pueden ser moléculas de bajo peso molecular u oligómeros o polímeros iónicos [49]. Geles físicos de quitosano también pueden obtenerse por efecto de formación de puentes de hidrogeno en donde el carácter hidrofílico del polímero y la movilidad de las cadenas son los principales parámetros de la gelificación [50]. Hidrogeles de quitosano generados por asociaciones hidrofóbicas se han producido empleando quitosano sustituido con cadenas alcalinas. En este tipo de derivado pueden observarse fenómenos de autoasociación. Los principales parámetros que influyen en la formación de este tipo de geles son la naturaleza y número

de sitios hidrofóbicos, la concentración del polímero, la temperatura y la fuerza iónica [51].

Muchas de las aplicaciones de los hidrogeles están relacionadas con la capacidad de hincharse en presencia de un disolvente como el agua, esto le permite potenciales aplicaciones en biomedicina como sistemas de liberación controlada y/o sostenida de principios activos. El hinchamiento en un hidrogel se debe a que al entrar en contacto el hidrogel con el disolvente, este penetra dentro de la red polimérica debido a la diferencia de un potencial químico del solvente dentro y fuera del gel, lo que provoca un flujo osmótico, generando el hinchamiento. A este proceso se le opone una fuerza elástica de parte de las cadenas de quitosano, hasta que ambos procesos se igualan y se establece el equilibrio [13].

Existen números métodos para formar estructuras de quitosano, como la formación de micro y nanopartículas, cápsulas mediante gelificación iónica, emulsión, coacervación-precipitación, siendo la principal aplicación de estos materiales los sistemas de liberación de fármacos [52]. El electrospinning ha sido utilizado para la formación de fibras [53]. El quitosano también ha sido aprovechado para formar películas y/o membranas, debido a que pueden lograrse buenas propiedades mecánicas y de permeabilidad; estas propiedades dependen en gran medida del peso molecular del quitosano, de su grado de cristalinidad y del contenido de humedad de los materiales [13].

A partir de quitosano se han formado también diversos materiales porosos, tales como membranas, películas, fibras, andamiajes, nanoesferas y materiales porosos nanoestructurados. En la mayoría de los casos la producción de estructuras porosas de quitosano requiere que se rompa la estructura microcristalina presente en el estado sólido para regenerarla al formar las estructuras deseadas. Esto se logra partiendo de soluciones de quitosano, debido a que no presenta propiedades termoplásticas. Se han reportado diversas técnicas para la formación de estructuras porosas de quitosano como, por ejemplo, la evaporación, el uso de porógenos, liofilización, hilado o por secado con CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas. Esta última técnica tiene la particularidad de que se eliminan los efectos de la tensión superficial de la fase fluida en el material.

## Materiales Porosos Nanoestructurados

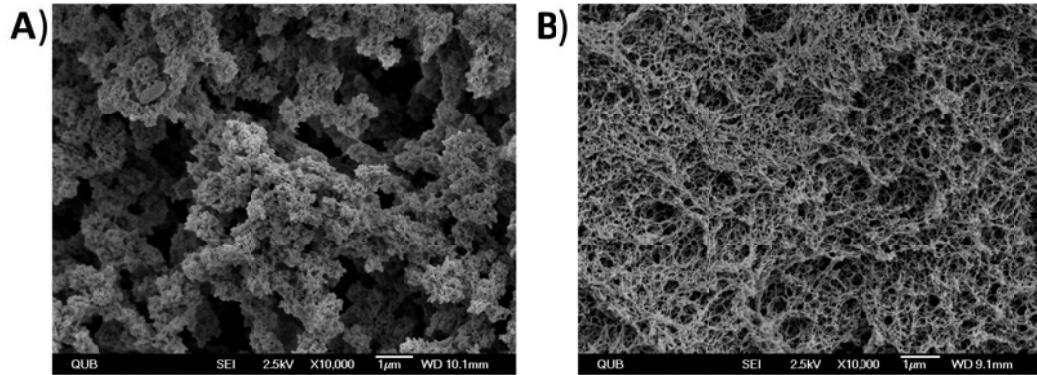
Recientemente se han utilizado diversos biopolímeros para la obtención de los materiales porosos nanoestructurados, llamados aerogeles. Estos materiales se caracterizan por una estructura de tipo mesoporosa con gran área superficial. El proceso general utilizado para la elaboración de aerogeles de biopolímeros consiste en remover la fase fluida de geles evitando la deformación de la estructura preformada en medida de lo posible. Esto se logra mediante técnicas de secado que reduzcan al mínimo la tensión superficial de la fase fluida. El proceso más utilizado es el de secado con fluido supercrítico, normalmente  $\text{CO}_2$ . En el caso de quitosano y otros polímeros naturales se producen hidrogeles, a estos se les realiza un intercambio de fase fluida sustituyendo el agua por algún compuesto con mayor miscibilidad en  $\text{CO}_2$ , normalmente alcohol o acetona, antes de sometidos al secado supercrítico [22] [54-56].

El estudio de aerogeles de quitosano es incipiente. Se han obtenido aerogeles a partir de geles físicos generados por precipitación por neutralización con NaOH de soluciones de Qs en HAc. Se utilizaron quitosanos provenientes de quitinas con diferente patrón cristalino ( $\alpha$  y  $\beta$ ) que mostraron áreas superficiales de 330 y 150  $\text{m}^2/\text{g}$  respectivamente. Mediante seguimiento con FTIR del proceso de sustitución de hidrógeno por deuterio fue posible observar mayor disponibilidad de los grupos funcionales en los aerogeles comparado con xerogeles (películas). Los autores de este estudio consideran que los aerogeles como los de quitosano pueden ser aplicados en catálisis, adsorción y detección química [56]. Otro tipo de aerogeles estudiados son formados a partir de hidrogeles entrecruzados covalentemente de quitosano con glutaraldehído, formaldehído o glioxal. El área superficial de estos aerogeles presentó variaciones dependiendo del tipo y concentración del entrecruzante, estando en el rango de 66-845  $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ . A los aerogeles se les evaluó también su capacidad de adsorción con un surfactante aniónico alcanzando una adsorción máxima de 1800 mg/g de aerogel [57]. También se han producido geles híbridos de quitosano con sílice, su formación parte de soluciones ácidas de quitosano para catalizar la hidrólisis y condensación de tetraetilsilicato. Los aerogeles formados de estos geles mostraron áreas superficiales entre 750-472  $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ , a estos geles se les evaluó su degradación

térmica, la cual fue alrededor de 700°C, en este estudio también se evaluó su biocompatibilidad mostrando altos valores de hemólisis pero un bajo valor de citotoxicidad [58]. Se han producido aerogeles en forma de microesferas. Su formación parte de una solución de quitosano con montmorillonita (Na-MMT), la cual por medio de goteo en una solución alcalina de NaOH se produce gelación en forma de microesferas, posteriormente se intercambia la fase fluida por alcohol y se somete a secado supercrítico con CO<sub>2</sub>. Esas microesferas presentaron áreas superficiales entre 180 a 320 m<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup>. Se les evaluó su capacidad de absorción de azul de metileno, mostrando un mayor eficiencia que xerogeles obtenidos de la misma solución [59]. De manera similar a este proceso se han obtenido microesferas de híbridas de quitosano con alcóxidos metálicos, pero la diferencia en la síntesis de las microesferas híbridas es que los compuestos metálicos se introducen en el intercambio de la fase fluida con alcohol. Los aerogeles que se obtienen en este proceso muestran estructuras mesoporosas y áreas superficiales entre 107-308 m<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup> dependiendo del tipo de alcóxido utilizado [60]. Durante el proceso de formación se ha observado que al intercambiar la fase fluida del hidrogel por un fluido con mayor afinidad al CO<sub>2</sub> y someter las estructuras a ScCO<sub>2</sub>, se logra mantener en gran medida la dispersión del hidrogel y se tiene un encogimiento mínimo.

Se ha demostrado que las características de la solución de quitosano determinan las propiedades estructurales del gel físico y en consecuencia del aerogel que se obtiene. Esto se ejemplifica el observar por microscopia de barrido electrónico las estructuras de aerogeles formados mediante procesos similares a partir de soluciones de un mismo lote de Qs disuelto en HAc y en FBS (Figura 2). Los aerogeles formados a partir de soluciones de quitosano en HAc mostraron una estructura aglomerada (Figura 2-A) con un área superficial de 887.1 m<sup>2</sup>/g. En cambio los aerogeles formados de soluciones de quitosano en FBS se observó una estructura fibrilar (Figura 2-B) con un área superficial de 322.7 m<sup>2</sup>/g [22]. Estas diferencias fueron relacionadas con el comportamiento y relación de las moléculas de quitosano en los distintos sistemas solventes. La funcionalidad de cada tipo de aerogeles pudiera estar relacionada con las diferencias estructurales mostradas en cada material. Al no tener el mismo patrón de ordenamiento molecular del quitosano es probable que la interacción con diferentes compuestos sea diferente en cada material. Es por esto que se

plantea estudiar las propiedades funcionales básicas de aerogeles provenientes de distintas soluciones de quitosano.



**Figura 2.** Morfología de aerogeles de quitosano obtenidas a partir de solución en HAc (A) y en FBS (B).

## **OBJETIVOS**

### Objetivo General

Determinar y comparar las propiedades funcionales básicas de materiales porosos nanoestructurados de quitosano obtenidos a partir de distintos tipos soluciones, preparadas en sistemas solventes ácido y neutro.

### Objetivos Particulares

- Preparación y caracterización viscosimétrica de las soluciones de quitosano en los sistemas solventes de ácido acético, ácido clorhídrico con la cantidad estequiométrica para solubilizar los grupos amino del quitosano y formaldehído bisulfito de sodio.
- Obtención y caracterización morfológica de los materiales porosos nanoestructurados de quitosano.
- Determinar y comparar las propiedades funcionales básicas de los distintos tipos de materiales porosos nanoestructurados de quitosano obtenidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

#### Quitosano

Para la elaboración de los materiales porosos nanoestructurados se utilizó un mismo lote quitosano (Qs) de la marca ChitoClear (No. TM 1961) procedente de caparazón de camarón de la especie *Pandalus borealis*. El Qs presenta un GA nominal de 20% (determinado por el proveedor mediante titulación conductimétrica).

#### Reactivos

Los reactivos y solventes utilizados en la preparación y análisis de soluciones y materiales fueron de grado analítico. Para el secado supercrítico se utilizó CO<sub>2</sub> líquido grado Coleman (99,99% pureza) de la marca Infra. A menos que se especifique de forma diferente, para la preparación de soluciones y reactivos se empleó agua deionizada y agua destilada para el lavado de los materiales obtenidos, ambas producidas localmente en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.

### Métodos

#### Sistemas de disolución de quitosano

Se manejaron tres distintos sistemas solventes para disolver el Qs. Un primer sistema comprendido por una disolución acuosa de un ácido orgánico débil como el ácido acético 0.3 M, una disolución ácida de un ácido orgánico fuerte



como el ácido clorhídrico en concentración estequiométrica para la protonación de los grupos amino de quitosano y una disolución acuosa de 2 % (p/p) de formaldehído bisulfito de sodio. Con cada sistema solvente se prepararon soluciones al 2 % (p/p) de quitosano para preparar los respectivos geles y aerogeles. Adicionalmente, para distintos análisis se prepararon soluciones en cada sistema solvente a la concentración requerida. Las soluciones en ácido acético (QsHAc) se prepararon disolviendo la cantidad necesaria de Qs en una solución de HAc 0.3 M según lo propuesto por Rinaudo y col. (1999) [25]. Para preparar las soluciones de cloruro de quitosano (QsHCl) se utilizó una solución de HCl 0.5 M de la cual se añadió sólo la cantidad suficiente para solubilizar una suspensión al 2 % de Qs en agua, empleando la cantidad estequiométrica de HCl para protonar los grupos amino del quitosano. El número de moles de los grupos amino de quitosano ( $n_{NH_2}$ ) por masa de quitosano se determinaron empleando la ecuación 4.

$$\text{Ecuación 4. } \frac{n_{NH_2}}{C_c V_c} = \frac{X_D}{X_D M_D + (1 - X_D) M_A}$$

Donde  $C_c$  es la concentración masa/volumen de la solución de quitosano,  $V_c$  es el volumen,  $X_D$  es el GD,  $M_D=161.1558$  g/mol que es la masa molar de la unidad desacetilada y  $M_A=203.1925$  g/mol que es la masa molar de la unidad acetilada [61]. Por último, se disolvió Qs en una solución formada por la sal compleja de formaldehído bisulfito de sodio al 2% (p/p) en agua destilada (QsFBS), según el procedimiento propuesto por Roberts (2005) [30].

Una vez preparadas las soluciones de Qs se removieron las impurezas pasándolas a través de un tamiz plástico y filtros de papel. Las soluciones muestra para análisis fueron filtradas secuencialmente a través de pre-filtros de 50  $\mu\text{m}$  (GF/C, Whatman) y a través de membranas de nitrato de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  (Versapor, Pall). Para la caracterización viscosimétrica las distintas soluciones de quitosano se filtraron adicionalmente por membranas de 0.2  $\mu\text{m}$  (NL 16, Whatman). En cualquier caso, las distintas soluciones de quitosano fueron procesadas o analizadas dentro de tres días de haber sido preparadas siendo mantenidas en contenedores cerrados en refrigeración hasta su uso.

Se determinó la viscosidad intrínseca  $[\eta]$  del Qs en cada tipo de solución por medio de viscosimetría capilar. Se utilizó un viscosímetro capilar tipo Ubbelohde para estimar la viscosidad relativa ( $\eta_{rel}$ ) y específica ( $\eta_{esp}$ ) de la solución a una

concentración dada, midiendo el tiempo promedio de paso de la solución a través del capilar contra el tiempo de paso promedio del solvente (Ecuaciones 5 y 6). Se determinaron cuatro puntos diluyendo cada sistema polímero-disolvente con agua destilada.

$$\text{Ecuación 5. } \eta_{rel} = \frac{\eta_{solución}}{\eta_{solvente}} \approx \frac{t_{solución}}{t_{solvente}}$$

$$\text{Ecuación 6. } \eta_{esp} = \frac{\eta_{solución} - \eta_{solvente}}{\eta_{solvente}} = \eta_{rel} - 1$$

La  $[\eta]$  se determinó por ajuste simultáneo de los datos experimentales con los modelos de Huggins, Kraemer y de punto único representados en la ecuación 7, 8 y 9 respectivamente.

$$\text{Ecuación 7. } \frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k'[\eta]^2c$$

$$\text{Ecuación 8. } \frac{\ln \eta_{sp}}{c} = [\eta] + k''[\eta]^2c$$

$$\text{Ecuación 9. } [\eta] = \frac{\sqrt{2 \cdot (\eta_{sp} - \ln \eta_{rel})}}{c}$$

## Formación de hidrogeles

Para la formación de las estructuras sólidas hidratadas (hidrogeles) se vertieron 2 g de solución de Qs al 2 % en vasos de precipitado de 10 mL (con diámetro interno promedio de 23.1 mm). La gelificación de las soluciones se indujo por difusión de vapor de hidróxido de amonio, adaptando el procedimiento propuesto por Montembault y col. (2005) [62]. El procedimiento de difusión se realizó en un recipiente cerrado herméticamente durante 24 horas. El exceso de  $\text{NH}_4\text{OH}$  fue removido de los geles obtenidos mediante lavados con agua destilada durante 3 días con recambio constante, empleando un sistema de recirculación apoyado en una bomba peristáltica, hasta alcanzar un pH neutro en el agua de lavado.

## **Formación de materiales porosos nanoestructurados**

Los materiales porosos nanoestructurados (aerogeles) fueron generados removiendo la fase fluida de los hidrogeles mediante el proceso de secado supercrítico con CO<sub>2</sub> (ScCO<sub>2</sub>). Dado que el agua no es miscible con el CO<sub>2</sub>, se intercambi6 por un líquido miscible como la acetona, mediante un gradiente de lavados con mezclas de acetona-agua al 30, 50, 80 y 100% en volumen. Una vez que se equilibraron los geles en acetona, se utiliz6 un extractor supercrítico de CO<sub>2</sub> (Sistema ESC MARC SIMS) para remover la fase fluida de las muestras. El proceso se llev6 a cabo por lotes de 8 geles, que se sometieron a un flujo (4800 cc/min) de CO<sub>2</sub> hasta completar un volumen de 50 L, a una presión de 150 bar y 40 °C de temperatura, posteriormente se mantuvo sin flujo por 2 h para finalizar el proceso repitiendo las condiciones de flujo inicial.

## **Caracterización de materiales porosos nanoestructurados**

Identidad Química. Se utiliz6 un espectrofot6metro de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) modelo Protege 460 (Nicolet Instrument Corp.) para determinar el espectro de infrarrojo del quitosano en polvo Primex y de los materiales porosos nanoestructurados, mediante la formación de pastillas de quitosano y KBr, se midi6 con 32 barridos a una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>. Para determinar el GA de cada muestra se obtuvo la absorbancia neta de las bandas centradas a 1320 y 1420 cm<sup>-1</sup> para sustituir su valor en la Ecuación 1 propuesta por Brugnerotto y colaboradores (2001).

Análisis Termogravimétrico. Se llev6 a cabo un estudio termogravimétrico del quitosano en polvo Primex y de los materiales porosos nanoestructurados empleando un analizador SDT 2960 (Simultaneous DSC-TGA, TA, instruments) y el software Thermal advantage Version 1.1 A 1999 (TA, instruments) para analizar las pérdidas de masa en las muestras. El intervalo de calentamiento fue de 20 a 1000 °C, a una velocidad de 10 °C/min. El análisis se realiz6 bajo una atm6sfera de nitr6geno con flujo de 24 cm<sup>3</sup>/min.

Morfología y análisis estructural. La morfología de los aerogeles se observó a través de un microscopio de barrido electrónico (SEM) JEOL JIB-4500 con un haz de electrones de 15 kV de intensidad a alto vacío. La estructura se examinó y se tomaron micrografías a diferentes ampliaciones. El área superficial, el volumen de poro y los isothermas de adsorción de los aerogeles se obtuvieron mediante un analizador de área superficial TriStar<sup>®</sup> II 3020 (Micromeritics Instrument Corporation). Este equipo genera curvas experimentales de adsorción y desorción de nitrógeno gas que permiten estimar el número de moléculas requeridas para cubrir un área superficial con una monocapa de moléculas adsorbidas, este se basa principalmente en la teoría de Brunauer-Emmett-Teller (BET) y también con el Método de Barret-Joyner-Halenda (BJH) que permite determinar el tamaño de los poros y la distribución de poros acumulado. Muestras de 0.05 g de cada tipo de aerogel producido se utilizaron para obtener el análisis de los isothermas BET.

### Propiedades Funcionales

Grado de Hinchamiento. Se determinó el grado de hinchamiento en el equilibrio de los materiales porosos nanoestructurados sumergiéndolos en 80 mL de agua destilada a diferentes temperaturas (10, 24, 40, 60 °C). Se monitoreó periódicamente la ganancia de peso de las muestras procurando remover el exceso de solvente con papel secante. La ecuación 10 fue utilizada para estimar el grado de hinchamiento en el equilibrio ( $W_{eq}$ ):

$$\text{Ecuación 10. } W_{eq} = \frac{P - P_0}{P_0} = \frac{P}{P_0} - 1$$

En donde  $P_0$  es el peso del aerogel seco y  $P$  es el peso del aerogel en estado húmedo [63]. Las medidas se realizaron por triplicado.

Coeficiente de Difusión Aparente. Se utilizaron los resultados de hinchamiento en el equilibrio de los materiales porosos nanoestructurados para determinar el coeficiente de difusión aparente ( $D$ ) del solvente a diferentes temperaturas

(10, 24, 40, 60 °C). Con estos valores fue posible modelar el proceso de difusión de acuerdo a la ecuación de difusión de Fick (Ecuación 11).

$$\text{Ecuación 11. } \frac{\partial C}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right)$$

Donde  $C$  representa la concentración dentro del aerogel al tiempo  $t$  y la localización  $x$ ,  $D$  es el coeficiente de difusión. Para la solución de la ecuación de Fick se consideró el caso de difusión a través de una geometría plana con espesor de  $2l$ , el coeficiente de difusión  $D$ , y la concentración uniforme  $C_0$ , en la región  $-l < x < l$  con la superficie mantenida a concentración constante  $C_1$ , la solución de la ecuación de Fick se convierte en la ecuación 12 [64].

$$\text{Ecuación 12. } \frac{W}{W_{max}} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} \exp\left(-\frac{D(2n+1)^2 \pi^2 t}{4l^2}\right)$$

Esta ecuación puede ser resuelta para los primeros 16 miembros y ajustarse a los datos experimentales a través de un proceso de ajuste no lineal asumiendo la relación  $D/l^2$  como el parámetro de ajuste. La ecuación se resolvió utilizando el algoritmo no lineal de mínimos cuadrados mediante el programa Origin 8.0.

Para determinar la energía de activación aparente de difusión durante el proceso de hinchamiento, se hizo un análisis de la dependencia del coeficiente de difusión aparente con la temperatura basándose en la ecuación de Arrhenius (Ecuación 13)[65].

$$\text{Ecuación 13. } D = D_0 \exp(-E_D/RT)$$

Donde  $E_D$  es el coeficiente de energía aparente del proceso de difusión,  $R$  es la constante de los gases.

Capacidad de Adsorción de Proteína. Se determinó la capacidad de adsorción de albúmina de suero bovino (BSA) en los materiales porosos nanoestructurados. Los aerogeles (triplicado) se hincharon en 5 mL de buffer de fosfato de potasio (pH=6.0) a temperatura ambiente (24 °C) hasta alcanzar el hinchamiento en el equilibrio ( $W_{eq}$ ), y suspendiéndose después en 5 mL de

solución de BSA (1.6 g/mL en buffer de fosfato de potasio, pH=6.0), bajo agitación a 150 rpm. Se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ L de la solución a distintos tiempos, a las cuales se les determinó el contenido de proteína por el método de Bradford [66]. Las lecturas de absorbancia a 595 nm se realizaron en un espectrofotómetro Cary 50 UV/Vis (Varian). La eficiencia de carga (EC) para BSA fue calculado de acuerdo a la ecuación 14.

$$\text{Ecuación 14. } EC = (m_0 - m)/M_q \quad (\text{mg BSA/mg material del soporte})$$

Donde  $m_0$  y  $m$  son la masa de BSA con respecto a la masa de BSA antes y después de la adsorción por los aerogeles de quitosano.  $M_q$  es la masa de los aerogeles de quitosano usados en el experimentos de adsorción [67].

Retención de Actividad de Enzima Inmovilizada. Se estimó la retención de actividad de enzima inmovilizada en los distintos aerogeles obtenidos. Proteasa tipo XIV de *Streptomyces Griseus* fue adsorbida en los materiales porosos nanoestructurados de la siguiente manera. Los aerogeles (triplicado) se hincharon en buffer (pH=7.5) compuesto por acetato de sodio 10 mM y acetato de calcio 5 mM a temperatura ambiente (24 °C), hasta alcanzar el hinchamiento en el equilibrio ( $W_{eq}$ ), se suspendieron después en 5 mL de solución de BSA (1.6 g/mL en buffer de fosfato de potasio, pH=6.0), bajo agitación a 150 rpm por 24 horas. Al final del tiempo de absorción se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ L al sobrenadante de las soluciones, determinando su contenido de proteína por el método de Bradford [66]. Las lecturas de absorbancia a 595 nm se realizaron en un espectrofotómetro Cary 50 UV/Vis (Varian). Los aerogeles se lavaron con 5 mL del buffer en que se hincharon por 30 minutos en agitación a 150 rpm.

La cantidad de proteína retenida por los aerogeles ( $P_r$ ) se calculó por la diferencia de proteína inicial ( $P_i$ ) con la cantidad de proteína final ( $P_f$ ), determinada del sobrenadante después del proceso de adsorción o la cantidad de proteína no adsorbida. La eficiencia de adsorción de la proteína en los aerogeles ( $EA$ ) fue determinada por la cantidad de proteína en la solución antes y después del proceso de adsorción, como se indica en la Ecuación 15 [68].

$$\text{Ecuación 15. } EA = \frac{P_i - P_f}{P_i} \cdot 100\%$$

Para el ensayo de actividad de la proteasa retenida en los aerogeles se preparó un sustrato de caseína al 0.65 %, disuelta en buffer de fosfato de potasio 50 mM (pH= 7.5 a 37 °C). Para estimar la actividad de proteasa inmovilizada a cada aerogel cargado se le adicionaron 5 mL de caseína al 0.65%, dejando incubar por 7 minutos. En cada ensayo se agregó sustrato a cada aerogel en un intervalo de 30 segundos. Para terminar la reacción se agregaron a cada muestra 10 mL de ácido trloroacético (TCA) al 5%. Cada muestra se centrifugó a 6000 rpm por 30 minutos y se leyó su absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Cary 50 UV/Vis (Varian). [69; 70]. Para determinar la actividad se consideró que una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima catalizando la formación de 1 µg de tirosina de caseína por minuto bajo las condiciones del ensayo (Ecuación 16).

$$\text{Ecuación 16. } U = \frac{\Delta abs_{280}/min \times 1000 \times 1.52}{V_r}$$

Donde 1.52 es el coeficiente de extinción de tirosina,  $V_r$  es el volumen de reacción en mL. [71].

La actividad específica de las enzimas sin inmovilizar ( $AEL$ ) se calculó considerando la  $U$  de la solución inicial de enzima ( $U_i$ ) y el contenido de proteína inicial (Ecuación 17).

$$\text{Ecuación 17. } AEL = \frac{U_i}{P_i}$$

La actividad específica de enzima retenida ( $AER$ ) se determinó por la relación de la actividad determinada en cada aerogel  $U$  y la proteína retenida ( $P_r$ ) (Ecuación 18).

$$\text{Ecuación 18. } AER = \frac{U}{P_r}$$

El porcentaje de retención de actividad (ERA) se obtuvo de la relación entre  $AEL$  y  $AER$  según la ecuación 19.

$$\text{Ecuación 19. } ERA = \frac{AEL}{AER} \cdot 100$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Soluciones de Quitosano

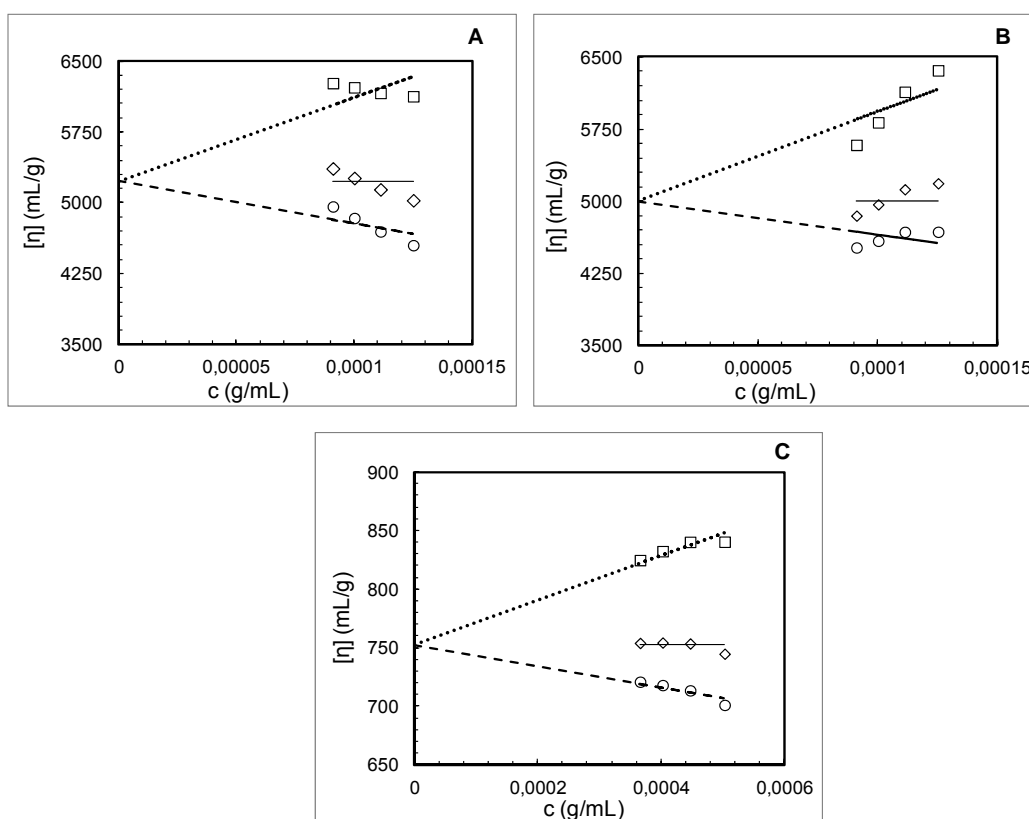
El quitosano normalmente se disuelve en solventes ácidos acuosos. A bajos pH (<6.5) los grupos amino se protonan promoviendo la solvatación de la molécula. Ácidos diluidos, principalmente ácido acético y clorhídrico, son comúnmente usados para producir soluciones de quitosano, las cuales han sido ampliamente estudiadas [21; 25; 32]. Sin embargo las soluciones de Qs en FBS han sido muy poco estudiadas [30]. A fin de obtener distintos aerogeles un mismo lote de quitosano fue usado para producir las soluciones en los sistemas solventes de HAc, HCl y FBS.

Las soluciones preparadas en ácido acético y ácido clorhídrico fueron viscosas y claras con un ligero tono amarillo, que resultó más notorio a mayores concentraciones de quitosano. Esta coloración es común en las soluciones de quitosano donde se utiliza ácido. En cambio, las soluciones de quitosano en FBS fueron completamente incoloras. Esta observación puede indicar que la absorción a ciertas longitudes de onda esté relacionada con las características de la interacción de la molécula del quitosano con el solvente.

La solubilidad del quitosano en los solventes ácidos acuosos depende principalmente del GA. En el sistema solvente de QsHAc se manejó un exceso de ácido en relación a la cantidad de los grupos aminos presentes en el quitosano. Para el sistema QsHCl se utilizó la cantidad estequiométrica suficiente para protonar los grupos amino del quitosano. Utilizando el GA de 16.3 % para el Qs Primex, previamente determinado por CP-MAS  $^{13}\text{C}$  RMN [22], se calculó el número de moles de grupos amino por masa de quitosano usando la Ecuación 4 (4.98 meq/unidad de D-glucosamina). De esta forma para 2 g de Qs Primex se necesitaron 19.93 mL de HCl 0.5 M para solubilizar el quitosano y obtener un total de 100 g de solución.



La viscosidad intrínseca  $[\eta]$  del Qs en ácido acético 0.3 M fue estimada en 5288 mL/g mediante un ajuste combinado de las ecuaciones de Huggins, Punto Único y Kraemer de los datos de viscosimetría de flujo capilar (Figura 3A). En la solución de Qs en ácido clorhídrico 0.5 M la viscosidad intrínseca  $[\eta]$  se estimó en 4995.901 mL/g (Figura 3B). En la disolución de Qs en formaldehído bisulfito de sodio se obtuvo una viscosidad intrínseca  $[\eta]$  de 752.72 mL/g; este novedoso sistema solvente tiene pocos estudios previos de sus soluciones, pero el valor se asemeja al obtenido por Lizardi y colaboradores en el 2007 en donde se calculó una  $[\eta]$  de 849.8 mL/g (Figura 3C) [22].



**Figura 3.** Estimación de la  $[\eta]$  de Qs en HAc-HCl y FBS.

Los puntos representados en cuadrado, rombo y círculo corresponden a los datos calculados por las ecuaciones de Huggins, Punto Único y Kraemer, respectivamente. Las correspondientes líneas son el ajuste a los modelos teóricos que indican el valor de  $[\eta]$  cuando  $C=0$ .

Los altos valores de  $[\eta]$  de las soluciones de QsHAc y QsHCl indican un gran volumen hidrodinámico de la cadena de Qs en solución. Probablemente se

deba a que las interacciones electrostáticas son mayores que las interacciones de baja energía, generando una conformación extendida de la cadena de Qs. En cambio el valor de  $[\eta]$  de la solución de QsFBS podría estar indicando una conformación de tipo de ovillo aleatorio, resultado de la formación de un producto ionizable entre el quitosano y la sal compleja.

## Producción de Materiales Porosos Nanoestructurados

### Estructuras Hidratadas de Quitosano

A partir de 3 diferentes soluciones de quitosano (QsHAc, QsHCl y QsFBS) se formaron geles físicos por degradación del sistema solvente mediante la difusión en fase gaseosa de hidróxido de amonio. Una vez obtenidos los geles se lavaron exhaustivamente con agua destilada hasta pH neutro. Los geles obtenidos de Qs en soluciones ácidas mostraron un color blanco opaco y resultaron poco flexibles y frágiles (Figura 4). Los hidrogeles de QsFBS tenían un color similar a los de soluciones ácidas, pero mostraron mayor firmeza y una flexibilidad limitada, además de un menor tamaño.



**Figura 4.** Hidrogeles de quitosano formados de los sistemas de QsHAc, QsHCl y QsFBS respectivamente de izquierda a derecha.

La fase fluida de los hidrogeles obtenidos fue sustituida por acetona mediante lavados repetidos con soluciones con un gradiente creciente de concentración de acetona (30, 50, 70, 100 y 100 %). Estos geles permanecieron en acetona pura hasta sustituir finalmente la fase líquida en el proceso de secado supercrítico. Se pudo observar que todos los geles de quitosano sufrieron una reducción de volumen durante el proceso de sustitución de la fase

líquida (Tabla 1). El desbalance termodinámico entre la red polimérica y nueva la fase líquida causa el reacomodo de las moléculas del gel a una configuración más estable.

**Tabla 1.** Reducción de volumen en la preparación de aerogeles de Qs.

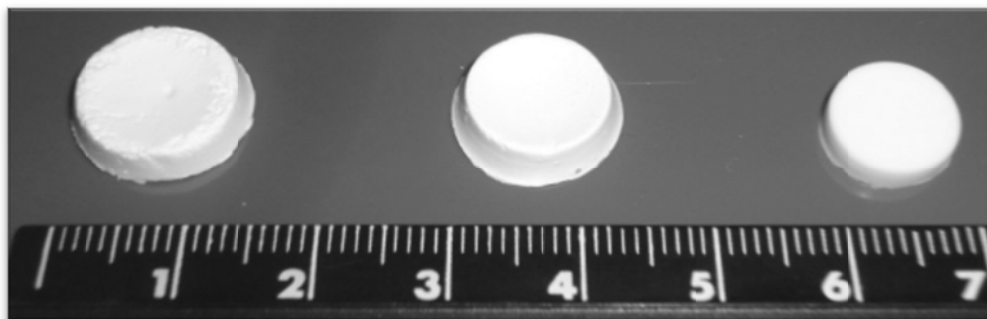
<b>Sistema Solvente</b>	<b>Reducción de Volumen de Hidrogeles a Acetogeles (%)<sup>a</sup></b>	<b>Reducción de Volumen de Acetogeles a Aerogeles (%)<sup>b</sup></b>
QsHAc	40	46
QsCl	26	49
QsFBS	33	43

a.- Reducción de volumen del hidrogel al sustituir la fase líquida por el gradiente de acetona (acetogel).

b.- Reducción de volumen del gel equilibrado en acetona contra el volumen del aerogel obtenido.

## **Aerogeles**

Los materiales porosos de quitosano se obtuvieron removiendo la fase líquida (acetona) de los diversos geles mediante CO<sub>2</sub> líquido utilizando la técnica de secado por encima del punto crítico (Figura 5). A los aerogeles provenientes de soluciones de quitosano en ácido acético se les denominó AQsHAc, a los formados a partir de soluciones en ácido clorhídrico AQsHCl y AQsFBS a los provenientes de solución en formaldehído bisulfito de sodio. Físicamente los aerogeles presentaron una coloración blanca, aunque los de FSB se apreciaron menos luminosos. Los aerogeles obtenidos a partir de soluciones ácidas resultaron rígidos pero relativamente frágiles. Este tipo de aerogeles presentó la presencia de una ligera película blanca se cree que su formación se dio durante el proceso de gelificación y no se eliminó en las etapas de lavado o secado. Los aerogeles de la solución de FBS, en cambio, no mostraron esta película, resultaron ser más resistentes y flexibles, pero con menor tamaño respecto a los provenientes de soluciones ácidas. Todos los aerogeles presentaron una disminución de volumen después del proceso de secado con CO<sub>2</sub> supercrítico (Tabla1).



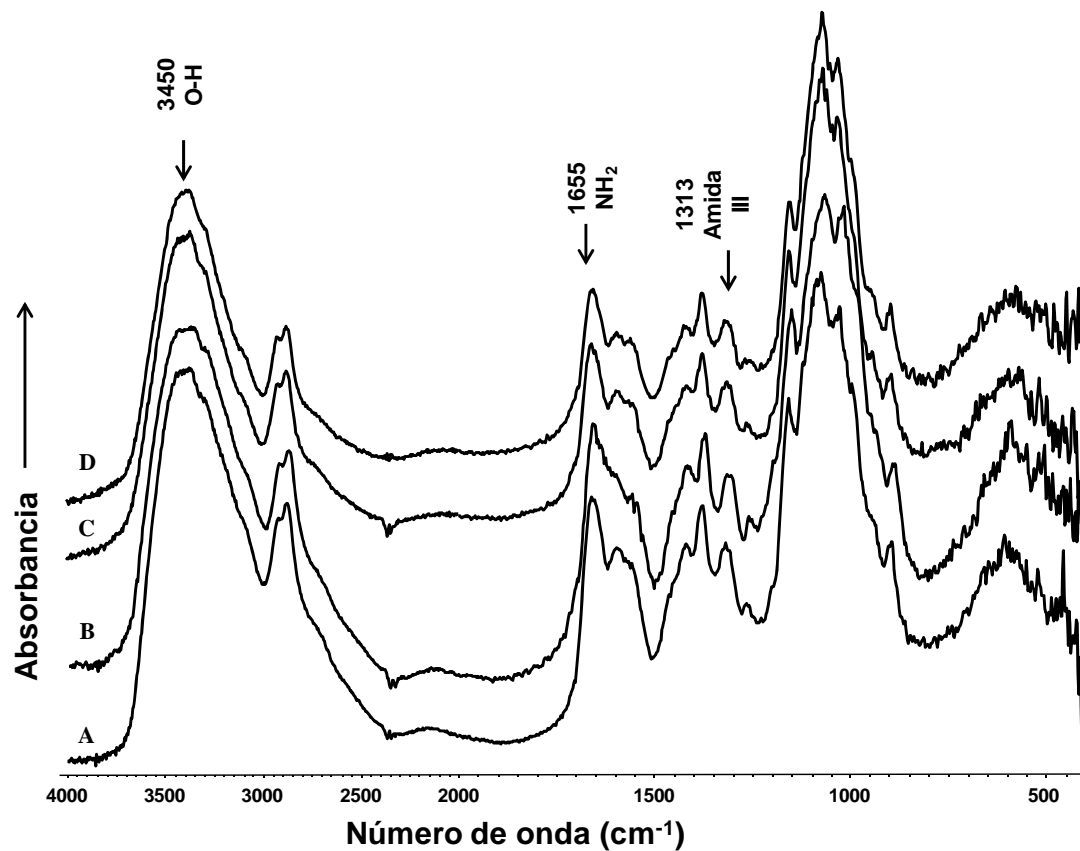
**Figura 5.** Materiales porosos nanoestructurados (aerogeles) de quitosano. De izquierda a derecha: AQsHAc, AQsHCl y AQsFBS.

### Composición Química

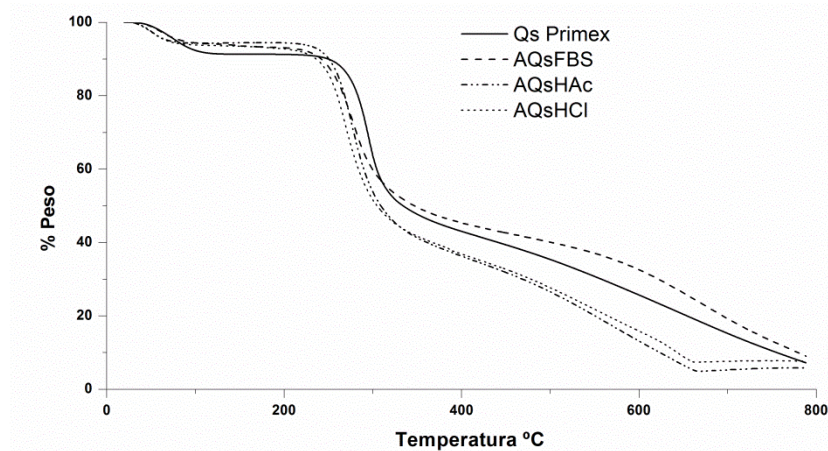
Se obtuvieron por medio de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) los espectros de los aerogeles, en donde al compararlos con el espectro del QsPrimex del cual proceden se logró apreciar similitud en las bandas características (Figura 6), manteniendo las bandas características a los  $3450\text{ cm}^{-1}$  (grupo O-H), a  $1655\text{ cm}^{-1}$  (amida I), a los  $1313\text{ cm}^{-1}$  (amida III),  $1082$  y  $1032\text{ cm}^{-1}$  (vibraciones del esqueleto propias de la estructura piranósica). El que se mantengan las bandas características del Qs en los aerogeles nos puede indicar que no existe derivatización durante el proceso de su elaboración.

### Análisis Termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TG) realizado a los aerogeles y al Qs Primex muestra perfiles de degradación térmica similares para el quitosano y los aerogeles (Figura 7). Los principales eventos que se pueden observar son: en primer lugar en el rango de los  $25$  a los  $130\text{ °C}$  ocurre la evaporación de agua débilmente enlazada con el polímero, el proceso de pirólisis ocurre en el rango de los  $200$  y  $400\text{ °C}$  y la reducción de masa por encima de los  $400\text{ °C}$  corresponde a las reacciones residuales de descomposición.



**Figura 6.** Espectros de FTIR de quitosano en polvo (A) y los aerogeles de AQsFBS (B), AQsHAc (C) y AQsCl (D).

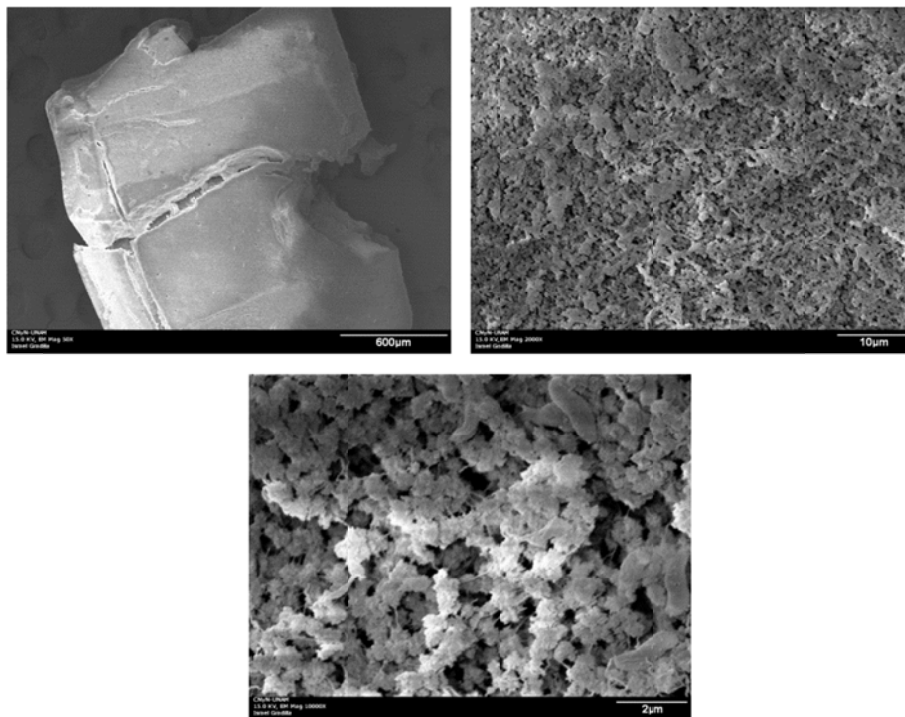


**Figura 7.** Curvas de TG de Qs en polvo (QsPrimex) y los aerogeles AQsFBS, AQsHAc y AQsHCl.

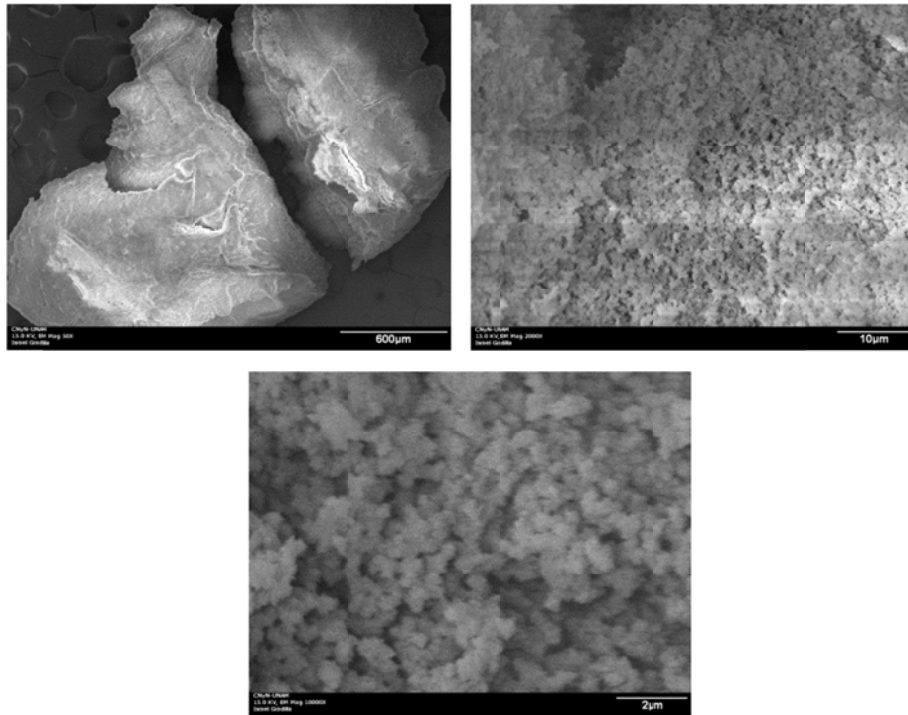
## Análisis Estructural

La morfología de los materiales porosos nanoestructurados fue analizada mediante microscopía de barrido electrónico (SEM). Una serie de micrográficas a diversas ampliaciones de cortes transversales de los materiales obtenidos se incluyen en las figuras 8, 9, y 10.

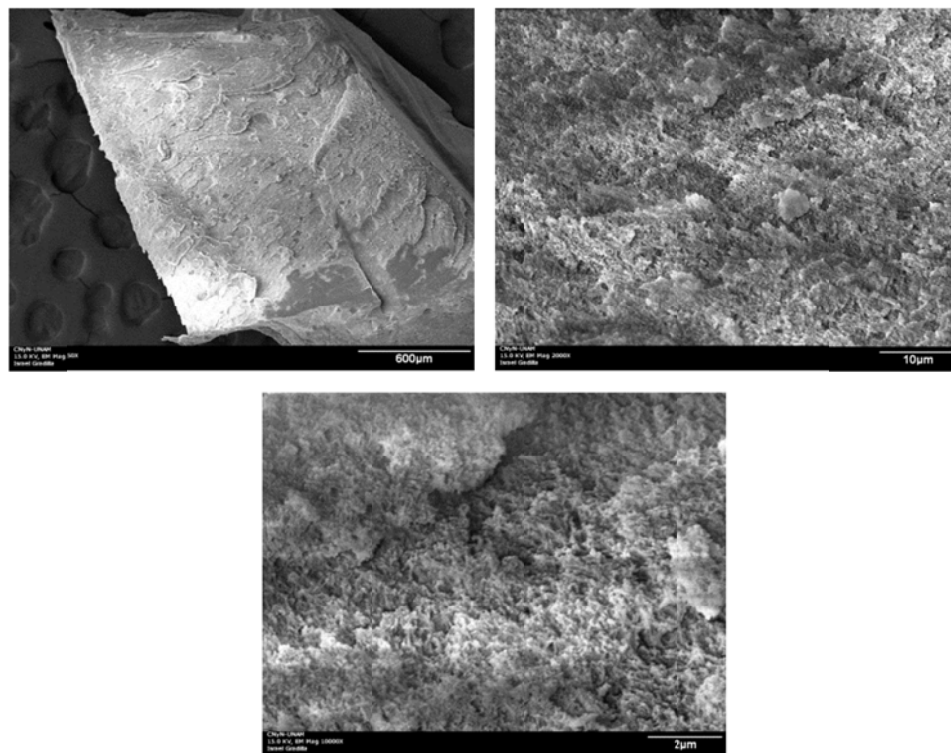
Las imágenes de SEM de los aerogeles de AQSHAc (Figura 8) muestran una estructura heterogénea. En la micrografía con mayor ampliación se observa una estructura aglomerada de forma granular, observándose en ella los poros del material. Los aerogeles AQSHCl (Figura 9) tienen una estructura muy parecida, pero se nota una mayor aglomeración del polímero, aunque sigue siendo una estructura homogénea.



**Figura 8.** Imágenes de SEM a distintas ampliaciones de aerogeles de AQSHAc.



**Figura 9.** Imágenes de SEM a distintas ampliaciones de aerogeles de AQSHCl.



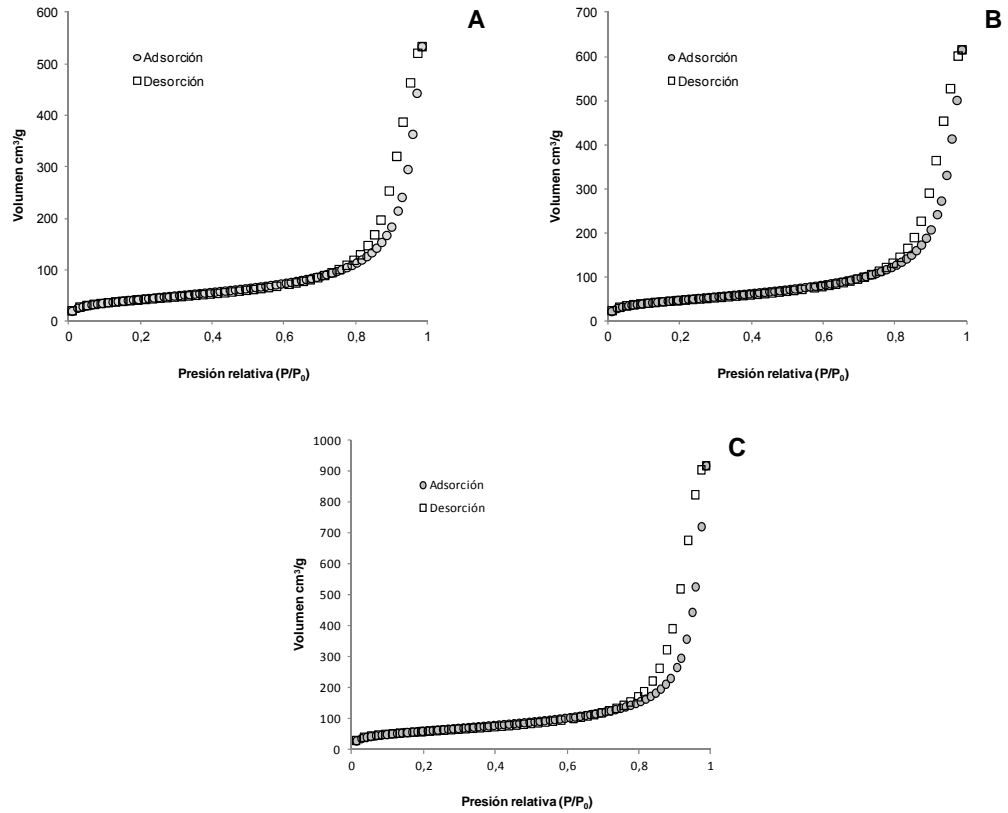
**Figura 10.** Imágenes de SEM a distintas ampliaciones de aerogeles de AQsFBS.

En cambio los materiales de AQsFBS (Figura 10) muestran una estructura más compacta comparada con las anteriores. En las imágenes puede distinguirse una red fibrosa relativamente homogénea a lo largo del material. Esta estructura, con mayor densidad aparente de quitosano, puede estar relacionada con las observaciones de mayor firmeza y menor fragilidad comparada con los que proceden de soluciones ácidas que resultan más frágiles.

### **Área Superficial Específica y Volumen de Poro**

Con los datos de los isothermas de adsorción BET (Figura 11) se calculó el área superficial específica ( $S_{\text{BET}}$ ), el volumen total de poro ( $V_p$ ) y el tamaño de poro promedio ( $T_p$ ) de los tres tipos de aerogeles (Tabla 2). El  $S_{\text{BET}}$  de los aerogeles obtenidos se encuentra en un rango de valores similares a datos reportados anteriormente para aerogeles de quitosano (330 y 150  $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) [72]. El volumen y tamaño de poro de los aerogeles producidos corresponden a materiales mesoporosos. Estos valores son similares al tamaños de poro (entre 12 y 25 nm) reportados en el estudio antes mencionado sobre aerogeles de quitosano. Las isothermas de adsorción de  $\text{N}_2$  de los aerogeles pueden ser catalogados como isothermas tipo IV, de acuerdo a la clasificación IUPAC, ya que presentan una histéresis incipiente a altas presiones relativas. Este comportamiento ha sido relacionado con materiales mesoporosos ( $T_p$  entre 2 y 50 nm) [73]. La distribución de poros de los aerogeles se muestra en la Figura 12. En todas los aerogeles se observa la presencia de micro y mesoporos. Una amplia distribución de mesoporos se ha encontrado en los aerogeles de AQsHAc y AQsHEs en el rango de los 15 a 30 nm, en cambio en los aerogeles de AQsFBS se muestra una distribución mesoporosa entre los 20 y 40 nm.

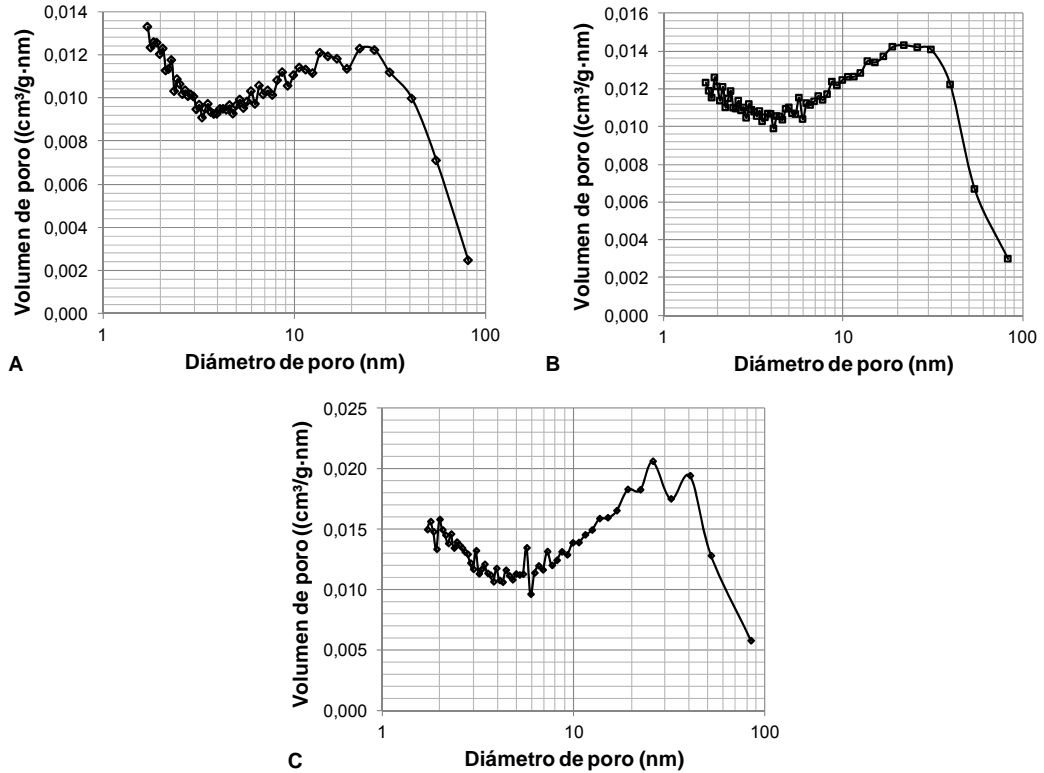




**Figura 11.** Isothermas BET de adsorción y desorción de N<sub>2</sub> de aerogeles de A) AQsHAc, B) AQsHCl y C) AQsFBS.

**Tabla 2.** Área superficial específica ( $S_{BET}$ ), el volumen total de poro ( $V_p$ ), tamaño de poro promedio ( $T_p$ ) de aerogeles de Qs.

Material	AQsHAc	AQsHCl	AQsFBS
$S_{BET}$ (m <sup>2</sup> /g)	159.7	178.3	223.2
$V_p$ (cm <sup>3</sup> /g)	0,4574	0.5131	0.6892
$T_p$ (nm)	11.46	11.51	12.35



**Figura 12.** Distribución de tamaño de poros de aerogeles de A) AQsHAc, B) AQsHCl y C) AQsFBS.

## Estudios de Hinchamiento de Aerogeles

### Grado de Hinchamiento

Las cinéticas de hinchamiento de los distintos aerogeles en agua destilada a 10, 24, 40 y 60 °C se ilustran en las Figuras 13, 14 y 15. Puede observarse que los aerogeles que proceden de soluciones ácidas alcanzan un hinchamiento en el equilibrio ( $W_{eq}$ ) a los pocos minutos, siendo aproximadamente el doble de tiempo que tardan los aerogeles de AQsHCl con respecto a los de AQsHAc. En cambio, los aerogeles de AQsFBS alcanzan el  $W_{eq}$  después de varias horas. En cuanto al grado de hinchamiento máximo que alcanza cada tipo de aerogel, los de AQsHCl y los de AQsFBS alcanzan a retener el doble de su peso en agua, mientras que los aerogeles de AQsHAc alcanzan el mayor grado de hinchamiento pues duplican la cantidad de agua absorbida por los otros aerogeles.

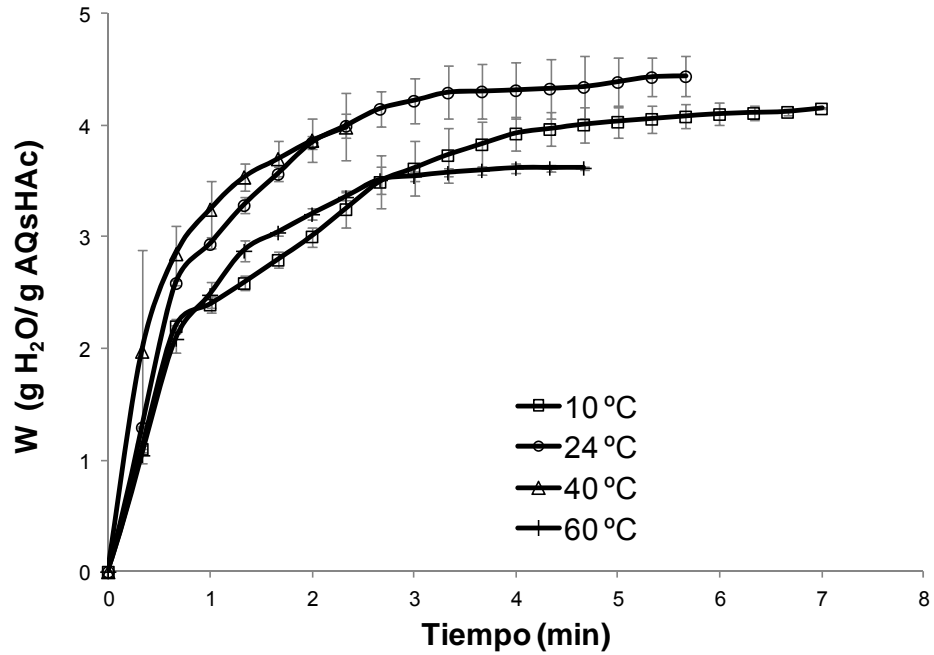


Figura 13. Hinchamiento en agua de AQsHAc a diferentes temperaturas.

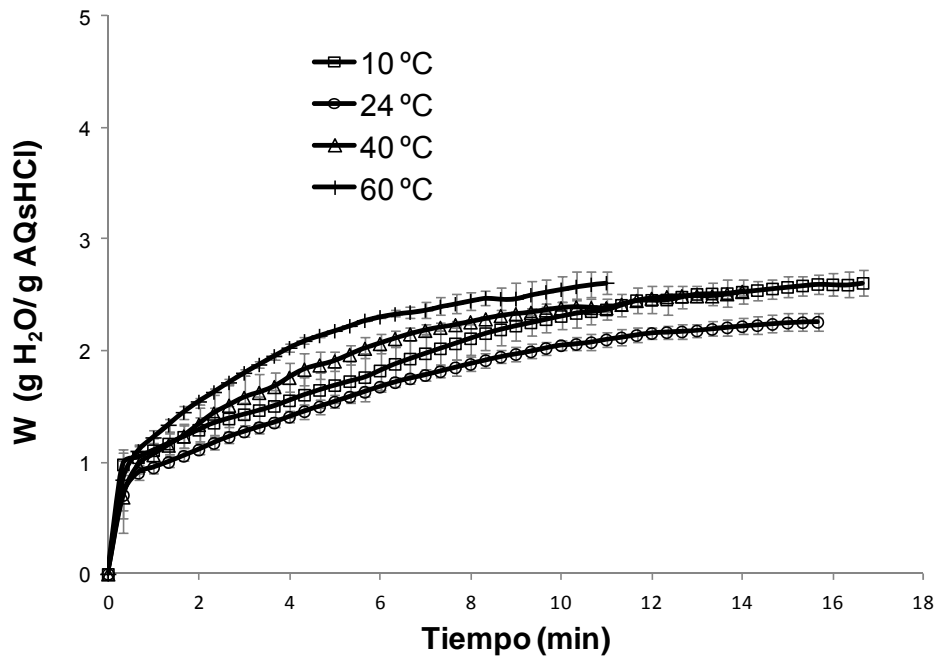
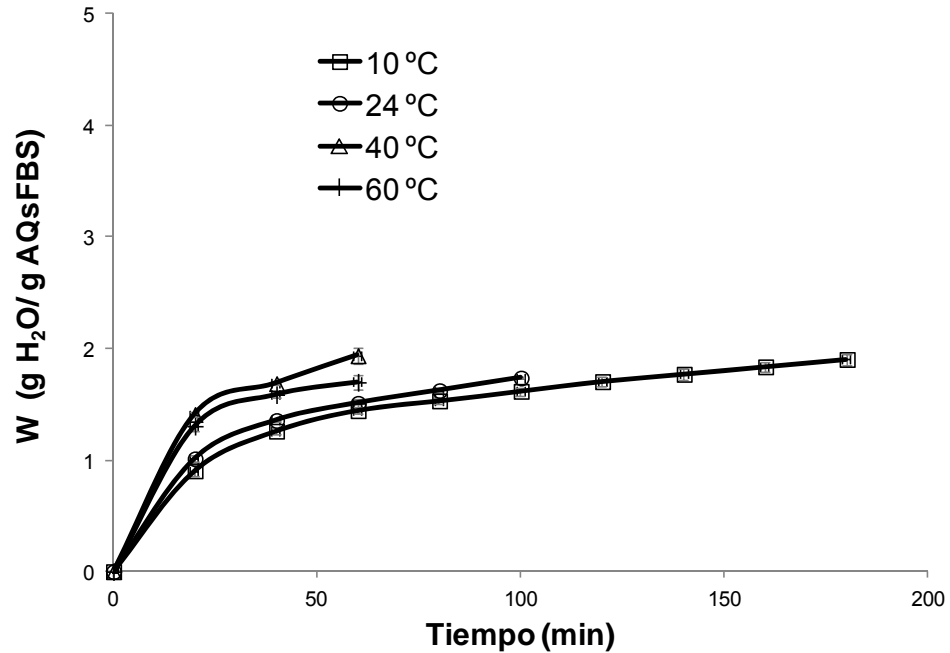


Figura 14. Hinchamiento en agua de AQsHCl a diferentes temperaturas.



**Figura 15.** Hinchamiento en agua de AQsFBS a diferentes temperaturas.

De acuerdo a lo observado, se aprecia que en los aerogeles de AQsHAc se alcanza el equilibrio de hinchamiento con más rapidez a 40 y 60 °C, a esta última temperatura se observa un menor hinchamiento con respecto a las otras en este tipo de aerogeles. En los aerogeles de AQsHCl se observa un fenómeno similar, sin embargo el patrón de hinchamiento a 60 °C no puede considerarse diferente al de las otras temperaturas. Adicionalmente, el  $W_{eq}$  a esa temperatura se alcanza con mayor rapidez. En los aerogeles de AQsFBS se observa que a altas temperaturas el hinchamiento en el equilibrio se alcanza con mayor rapidez (60 min), en cambio a bajas temperaturas requiere de mayor tiempo para alcanzar el equilibrio, Los datos de tiempo para alcanzar el equilibrio ( $t_{eq}$ ) y el  $W_{eq}$  se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Parámetros de hinchamiento en agua de distintos aerogeles de Qs.

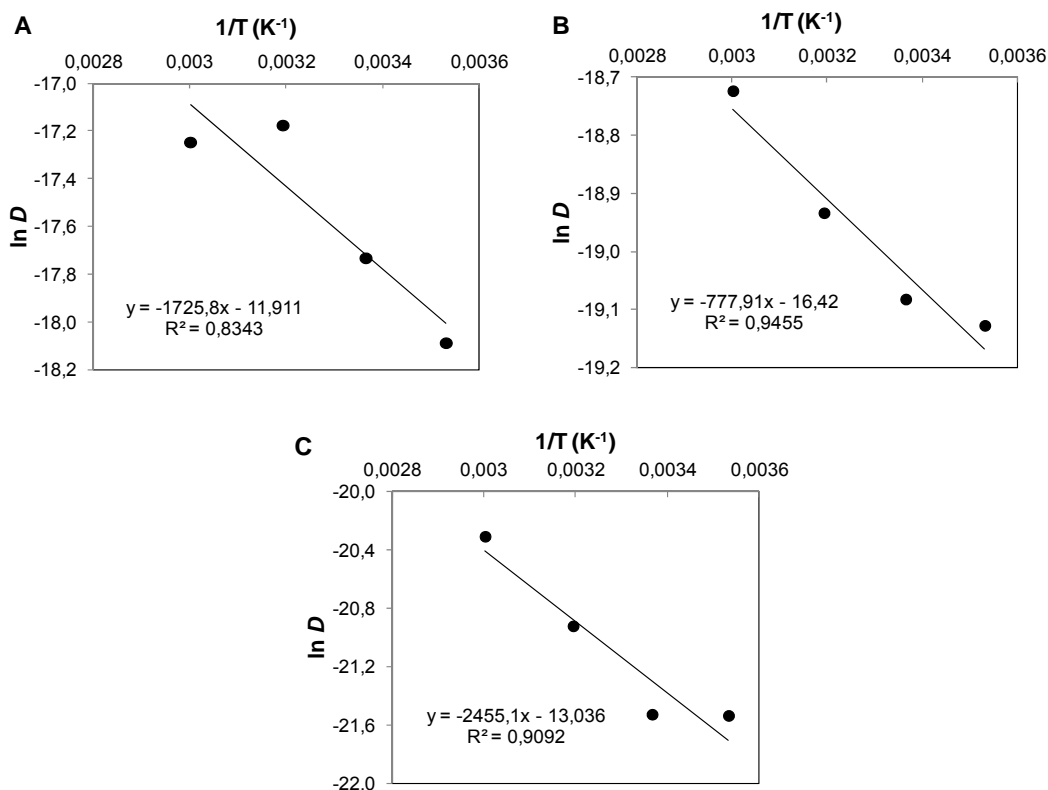
Temp °C	AQsHAc		AQsHCl		AQsFBS	
	$t_{eq}$ (min)	$W_{eq}$ ± SD	$t_{eq}$ (min)	$W_{eq}$ ± SD	$t_{eq}$ (min)	$W_{eq}$ ± SD
10	7:00	4.15 ± 0.01	16:40	2.61 ± 0.12	180	1.90 ± 0.05
24	5:40	4.44 ± 0.18	15:40	2.26 ± 0.07	100	1.74 ± 0.01
40	2:20	3.99 ± 0.30	14:00	2.53 ± 0.04	60	1.94 ± 0.07
60	4:40	3.62 ± 0.01	11:00	2.61 ± 0.11	60	1.70 ± 0.07

### Coeficientes de Difusión y Energías de Activación

El hinchamiento en los aerogeles se da por la difusión del solvente en la matriz del material. De acuerdo con esto, se utilizaron los valores obtenidos en el estudio de hinchamiento y, aplicando la Ecuación 12, se obtuvieron los coeficientes de difusión aparente ( $D$ ). En la Tabla 4 puede observarse que los mayores valores corresponden a los aerogeles de soluciones ácidas (AQsHAc y AQsHCl). Esto concuerda con los  $t_{eq}$  observados, así los aerogeles con menor difusión, AQsFBS requieren mayor tiempo para alcanzar el equilibrio. Respecto a la temperatura, se observa que a temperaturas sobre 40 °C se alcanzan los mayores valores de  $D$ , esto muestra la influencia de la temperatura en la difusión del líquido en la matriz de los aerogeles. Los valores más bajos del coeficiente de difusión aparente de los tres tipos de aerogeles se muestran en los de AQsFBS, esto probablemente se deba a que el agua necesita de mayor tiempo para cubrir el área superficial y a que cuenta con una mayor distribución de mesoporos, comparados con los otros aerogeles. El parámetro de energía de activación de difusión aparente ( $E_D$ ) relacionado al proceso de hinchamiento de los distintos aerogeles se calculó a partir de gráficas de tipo Arrhenius de los coeficientes de difusión (Figura 16). Dado que los valores de  $E_D$  son mayores en los aerogeles de AQsFBS, esto nos puede indicar que el proceso de hinchamiento requiere de mayor energía comparado con los otros dos tipos de aerogeles.

**Tabla 4.** Coeficientes de difusión aparente y energías de activación aparente de los distintos aerogeles de Qs.

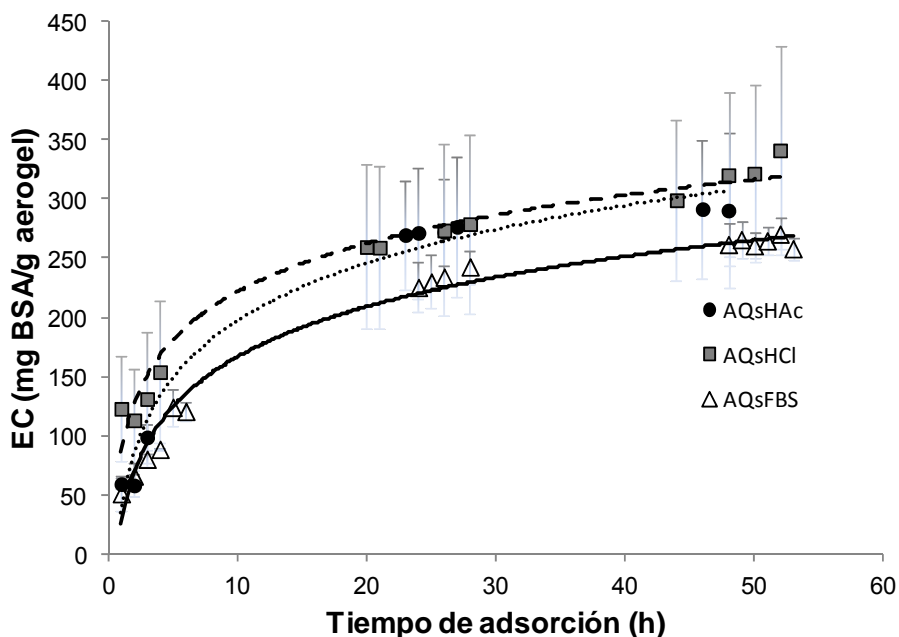
Material	$D$ ( $m^2/s$ )				$E_D$ ( $kJ mol^{-1}$ )
	10 °C	24 °C	40 °C	60 °C	
<b>AQsHAc</b>	1.40 E-08	1.99 E-08	3.48 E-08	3.24 E-08	14.4
<b>AQsHCl</b>	2.61 E-09	2.26 E-09	2.53 E-09	2.61 E-09	6.5
<b>AQsFBS</b>	1.90 E-10	4.48 E-10	8.21 E-10	1.52 E-09	20.4



**Figura 16.** Dependencia de los coeficientes de difusión aparente de agua con la temperatura para los distintos aerogeles. A) AQsHAc, B) AQsHCl y C) AQsFBS.

### Adsorción de Proteína

Las cinéticas de adsorción de BSA en los aerogeles de AQSHAc, AQSHCl y AQsFBS, se muestra en la Figura 17. Altos valores de adsorción se observaron dentro de las primeras 30 h de la cinética. En todos los casos los niveles de saturación de las matrices se alcanzaron gradualmente alrededor de las 50 h. Los aerogeles de AQSHAc presentaron una eficiencia de carga máxima ( $EC_{max}$ ) de 291 mg BSA/g de aerogel a las 46 h. En los AQSHCl la  $EC_{max}$  fue de 341 mg BSA/g de aerogel a las 50 h, y en los AQsFBS la  $EC_{max}$  fue de 271 mg BSA/g de aerogel a las 50 h. Los valores de  $EC_{max}$  son similares a los reportados para microesferas de quitosano entrecruzadas químicamente, en donde reportan una EC a pH de 6.08 de 250 mg BSA/g de polímero. En ese mismo estudio hacen reportes de adsorción con respecto a la concentración de BSA, reportando a concentraciones de BSA entre 1 y 2 mg/mL EC de 200 y 320 mg BSA/g de polímero [67].



**Figura 17.** Cinética de eficiencia de carga (EC) de albúmina de suero bovino (BSA) en aerogeles de AQSHAc, AQSHCl y AQsFBS.

## Retención de Actividad de Enzima Inmovilizada

Una forma de expresar la retención de actividad de enzima inmovilizada en los aerogeles es por medio de la eficiencia de retención de actividad (*ERA*), la cual permite expresar la actividad específica de la enzima con respecto a su contenido de proteína (Tabla 5). Los aerogeles de AQsHCl obtuvieron una mayor *ERA* que los AQsHAc y AQsFBS. Aunque la eficiencia de retención de proteína (*EAP*) es similar en los tres aerogeles, pudiera ser que haya mayor disponibilidad de los péptidos en el AQsHCl expresándose en una mayor retención de actividad. Estudios de adsorción de Proteasa tipo XIX de *Aspergillus sojae* con hidrogeles poliónicos de quitosano-xantana muestran eficiencia de inmovilización del 77 %, en el caso de los aerogeles es mucho menor la eficiencia de retención de actividad de los aerogeles (4.9-18.3 %); esto podría deberse a que se manejaron condiciones ácidas mientras que en los aerogeles los experimentos se hicieron a pH 7.5 en donde la proteasa tipo XIV de *Streptomyces Griseus* muestra su mayor estabilidad.

**Tabla 5.** Retención de actividad de enzima inmovilizada en aerogeles de Qs.

Material	AQsHAc	AQsHCl	AQsFBS
<i>EAP</i> (%) <sup>a</sup>	82.6 ± 0.3	81.2 ± 0.9	81.77 ± 0.1
<i>AEL</i> (U/mg) <sup>b</sup>	0.362	0.549	0.384
<i>AER</i> (U/mg) <sup>c</sup>	0.032 ± 0.002	0.101 ± 0.018	0.019 ± 0.006
<i>ERA</i> (%) <sup>d</sup>	8.72 ± 0.98	18.31 ± 3.71	4.92 ± 1.60

a Eficiencia de adsorción de proteína, b Act. esp. de enzima libre, c Act. esp. Enzima retenida, d Eficiencia de retención de actividad.



## CONCLUSIONES

Las propiedades funcionales del quitosano le proveen gran versatilidad y potenciales aplicaciones en diversos campos. Los materiales porosos nanoestructurados formados a partir de quitosano siguen manteniendo parte de sus principales características fisicoquímicas, pero cambiando muchas otras propiedades, principalmente en su estructura. El tipo de su estructura que presenta parece tener una relación con la disposición que tiene en solución la molécula de quitosano, las interacciones electrostáticas entre la cadena y dentro de la misma cadena están relacionadas con el tipo de disolvente del quitosano. Los hidrogeles que se forman al sacar de solución al quitosano presentan diferentes características entre si y el someterlos a la técnica de secado supercrítico con CO<sub>2</sub> permite mantener la dispersión de las cadenas de quitosano en su interior.

La caracterización corrobora que los aerogeles se pueden considerar como materiales porosos nanoestructurados al tener una distribución mesoporosa. El estudio de hinchamiento mostró la difusión del agua a través de la estructura mesoporosa, en donde los aerogeles son capaces de retener de 2 a 4 veces su peso en agua. La difusión del solvente con la temperatura indicó que a altas temperaturas hay un incremento de la difusión reflejado en la energía de activación de cada aerogel.

La funcionalidad de los aerogeles ha permitido ver que el resultado varía dependiendo de las estructuras. La adsorción de proteínas alcanzó una mayor eficiencia de carga en los aerogeles de soluciones ácidas, pero el aerogel de AQsFBS alcanzó en mayor tiempo la máxima adsorción de la proteína modelo. La retención de enzima reflejó una mayor retención de la actividad en los aerogeles de AQsHCl. En la evaluación de la funcionalidad se observó que los aerogeles presentan distinto comportamiento, y esto parece estar relacionado con la microestructura de cada aerogel.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Herrera, J. R. (1978). *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*. Cambridge: MIT Sea Grant Program.
2. Sannan, T., Kurita, K., & Iwakura, Y. (1975). Studies on chitin, 1. Solubility change by alkaline treatment and film casting. *Die Makromolekulare Chemie*, 176(4), 1191-1195.
3. Austin, P. R. (1977). Chitin Solution: US Patent 4,059,457.
4. Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632.
5. Tan, S. C., Tan, T. K., Wong, S. M., & Khor, E. (1996). The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. *Carbohydrate Polymers*, 30(4), 239-242.
6. Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. A. Q. (1997). Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food Chemistry*, 60(4), 605-610.
7. Roberts, G. A. F. (1992). *Chitin Chemistry*: Macmillan Publishers Limited.
8. Mathur, N. K., & Narang, C. K. (1990). Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal of Chemical Education*, 67(11), 938.
9. F. Goycoolea, E. A., R. Mato (Ed.). (2004). *Caracterización de quitina y quitosano. Capítulo 3, Fuentes y procesos de obtención*. Lima, Peru: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Peru.
10. Kurita, K., Sannan, T., & Iwakura, Y. (1977). Studies on chitin, 4. Evidence for formation of block and random copolymers of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine by hetero- and homogeneous hydrolyses. *Die Makromolekulare Chemie*, 178(12), 3197-3202.
11. Sannan, T., Kurita, K., & Iwakura, Y. (1976). Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility. *Die Makromolekulare Chemie*, 177(12), 3589-3600.
12. Inoue, Y. (1997). NMR Determination of the degree of acetylation. In E. R. P. R. A. A. Muzarrelli (Ed.), *Chitin Handbook* (pp. 133-135). Atec, Grottammare, Italy: European Chitin Society.
13. W. Argüelles-Monal, A. H. C., N.. Acosta, G Galed, A. Gallardo, B. Miralles, C. Peniche, J. San Roman (Ed.). (2004). *Caracterización de quitina y quitosano. Capítulo 4, Quitina y quitosano: obtención, caracterización y*

*aplicaciones*. Lima, Peru: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Peru.

14. Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan--A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36(8), 981-1014.

15. Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42(8), 3569-3580.

16. Muzzarelli, R. A. A., & Rocchetti, R. (1985). Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 5(6), 461-472.

17. dos Santos, Z. M., Caroni, A. L. P. F., Pereira, M. R., da Silva, D. R., & Fonseca, J. L. C. (2009). Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis. *Carbohydrate Research*, 344(18), 2591-2595.

18. Kasaai, M. R. (2009). Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1667-1676.

19. Sperling, L. H. (2005). *Introduction to Physical Polymer Science*: Wiley.

20. Sun, S. F. (2004). *Physical Chemistry of Macromolecules: Basic Principles and Issues*: Wiley.

21. Rinaudo, M., Milas, M., & Le Dung, P. (1993). Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int J Biol Macromol*, 15(5), 281-285.

22. Lizardi-Mendoza, J. (2007). *Structured Porous Materials of Chitin and Chitosan*. Queen's University Belfast, Belfast, Northern Ireland, UK.

23. McClements, D. J. (2005). *Food Emulsions: Principles, Practice, And Techniques*: CRC PressINC.

24. Domard, A. (1997). *Chitosan Interactions, Advances in Chitin Science Vol. II*. Lyon: Jacques André

25. Rinaudo, M., Pavlov, G., & Desbrières, J. (1999). Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*, 40(25), 7029-7032.

26. Schatz, C., Viton, C., Delair, T., Pichot, C., & Domard, A. (2003). Typical Physicochemical Behaviors of Chitosan in Aqueous Solution. *Biomacromolecules*, 4(3), 641-648.

27. Rinaudo, M., Pavlov, G., & Desbrières, J. (1999). Solubilization of Chitosan in Strong Acid Medium. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 5(3), 267-276.

28. Hamdine, M., Heuzey, M.-C., & Bégin, A. (2005). Effect of organic and inorganic acids on concentrated chitosan solutions and gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 37(3), 134-142.
29. Roberts, G. A. F. (2003). Chitosan condensation products, their preparation and their uses (Vol. 20030055211). Nottinghamshire, GB.
30. Roberts, G. A. F. (2005). *A novel solvent system for chitosan*, *Advances in Chitin Science Vol. VIII*. Poznan.
31. Hwang, J. K., & Shin, H. H. (2000). Rheological properties of chitosan solutions. *Korea-Australia Rheology Journal*, 12(3-4), 175-179.
32. Desbrieres, J. (2002). Viscosity of Semiflexible Chitosan Solutions: Influence of Concentration, Temperature, and Role of Intermolecular Interactions. *Biomacromolecules*, 3(2), 342-349.
33. Kasaai, M. R., Charlet, G., & Arul, J. (2000). Master curve for concentration dependence of semi-dilute solution viscosity of chitosan homologues: the Martin equation. *Food Research International*, 33(1), 63-67.
34. Kurita, K. (1998). Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3), 117-120.
35. Vasnev, V. A., Tarasov, A. I., Markova, G. D., Vinogradova, S. V., & Garkusha, O. G. (2006). Synthesis and properties of acylated chitin and chitosan derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 64(2), 184-189.
36. Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar Biotechnol (NY)*, 8(3), 203-226.
37. E. Agullo, L. A., A. Pastor de Abram, M. S. Rodriguez, F. Valenzuela (Ed.). (2004). *Aplicaciones en alimentación y control ambiental. Capítulo 5, Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*. Lima, Peru: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Peru.
38. Domard, A. (1987). pH and c.d. measurements on a fully deacetylated chitosan: application to Cull-polymer interactions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 9(2), 98-104.
39. Muzzarelli, R. A. A., Peter, M. G., & Society, E. C. (1997). *Chitin Handbook*: Università di Ancona.
40. Argüelles-Monal, W., Cabrera, G., Peniche, C., & Rinaudo, M. (2000). Conductimetric study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and polygalacturonic acid. *Polymer*, 41(7), 2373-2378.
41. Konovalova, I. N., Novikov, V. Y., Stepanova, N. V., & Reut, K. V. (2004). Recovery of Lipids from Aqueous Dispersions with Chitosan Solutions. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 77(2), 254-259.
42. Helgason, T., Gislason, J., McClements, D. J., Kristbergsson, K., & Weiss, J. (2009). Influence of molecular character of chitosan on the adsorption of chitosan to oil droplet interfaces in an in vitro digestion model. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2243-2253.

43. Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34(7), 641-678.
44. Zeng, X., & Ruckenstein, E. (1996). Control of Pore Sizes in Macroporous Chitosan and Chitin Membranes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 35(11), 4169-4175.
45. Bhattarai, N., Gunn, J., & Zhang, M. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 83-99.
46. García-González, C. A., Alnaief, M., & Smirnova, I. (2011). Polysaccharide-based aerogels—Promising biodegradable carriers for drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1425-1438.
47. Peppas, N. A. (1987). *Hydrogels in Medicine and Pharmacy: Properties and applications*: CRC Press.
48. Berger, J., Reist, M., Mayer, J., Felt, O., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 35-52.
49. Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm*, 57(1), 19-34.
50. Vachoud, L., Zydowicz, N., & Domard, A. (2000). Physicochemical behaviour of chitin gels. *Carbohydrate Research*, 326(4), 295-304.
51. Desbrières, J., Martinez, C., & Rinaudo, M. (1996). Hydrophobic derivatives of chitosan: Characterization and rheological behaviour. *International Journal of Biological Macromolecules*, 19(1), 21-28.
52. Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., & Aminabhavi, T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 100(1), 5-28.
53. Geng, X., Kwon, O.-H., & Jang, J. (2005). Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials*, 26(27), 5427-5432.
54. Valentin, R., Bonelli, B., Garrone, E., Di Renzo, F., & Quignard, F. (2007). Accessibility of the functional groups of chitosan aerogel probed by FT-IR-monitored deuteration. *Biomacromolecules*, 8(11), 3646-3650.
55. Quignard, F., Di Renzo, F., & Guibal, E. (2010). From Natural Polysaccharides to Materials for Catalysis, Adsorption, and Remediation. In A. P. Rauter, P. Vogel & Y. Queneau (Eds.), *Carbohydrates in Sustainable Development I* (Vol. 294, pp. 165-197): Springer Berlin / Heidelberg.
56. Quignard, F., Valentin, R., & Di Renzo, F. (2008). Aerogel materials from marine polysaccharides. *New Journal of Chemistry*, 32(8), 1300.

57. Chang, X., Chen, D., & Jiao, X. (2008). Chitosan-based aerogels with high adsorption performance. *J Phys Chem B*, 112(26), 7721-7725.
58. Ayers, M. R., & Hunt, A. J. (2001). Synthesis and properties of chitosan-silica hybrid aerogels. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 285(1-3), 123-127.
59. Ennajih, H., Bouhfid, R., Essassi, E. M., Bousmina, M., & El Kadib, A. (2012). Chitosan-montmorillonite bio-based aerogel hybrid microspheres. *Microporous and Mesoporous Materials*, 152(0), 208-213.
60. Kadib, A. E., Molvinger, K., Cacciaguerra, T., Bousmina, M., & Brunel, D. (2011). Chitosan templated synthesis of porous metal oxide microspheres with filamentary nanostructures. *Microporous and Mesoporous Materials*, 142(1), 301-307.
61. Tavares, I. S., Caroni, A. L. P. F., Neto, A. A. D., Pereira, M. R., & Fonseca, J. L. C. (2012). Surface charging and dimensions of chitosan coacervated nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90(0), 254-258.
62. Montembault, A., Viton, C., & Domard, A. (2005). Rheometric Study of the Gelation of Chitosan in Aqueous Solution without Cross-Linking Agent. *Biomacromolecules*, 6(2), 653-662.
63. Cárdenas, A., Argüelles-Monal, W., Goycoolea, F. M., Higuera-Ciapara, I., & Peniche, C. (2003). Diffusion Through Membranes of the Polyelectrolyte Complex of Chitosan and Alginate. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), 535-539.
64. Crank, J. (1979). *The Mathematics Diffusion*: Oxford Science Pub.
65. Argüelles-Monal, W., Hechavarría, O. L., Rodríguez, L., & Peniche, C. (1993). Swelling of membranes from the polyelectrolyte complex between chitosan and carboxymethyl cellulose. *Polymer Bulletin*, 31(4), 471-478.
66. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
67. Wang, L.-Y., Ma, G.-H., & Su, Z.-G. (2005). Preparation of uniform sized chitosan microspheres by membrane emulsification technique and application as a carrier of protein drug. *Journal of Controlled Release*, 106(1-2), 62-75.
68. Wang, W., Jiang, Y., Zhou, L., & Gao, J. (2011). Comparison of the Properties of Lipase Immobilized onto Mesoporous Resins by Different Methods. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(5), 561-572.
69. Beynon, R. J., & Bond, J. S. (2001). *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*: Oxford University Press.
70. Magnin, D., Dumitriu, S., & Chornet, E. (2003). Immobilization of Enzymes into a Polyionic Hydrogel: ChitoXan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 18(5), 355-373.

71. Castillo-Yañez, F. J., Pacheco-Aguilar, R., Garcia-Carreño, F. L., & Toro, M. (2004). Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chemistry*, 85(3), 343-350.
72. Robitzer, M., & Quignard, F. (2011). Marine polysaccharides and their conversion into functional materials. *Chimia (Aarau)*, 65(1-2), 81-84.
73. Sing, K. S. W., Everett, D. H., Haul, R. A. W., Moscou, L., Pierotti, R. A., Rouquerol, J., et al. (1985). Reporting Physisorption Data for Gas/Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity. *Pure Appl. Chem.*, 57(4), 603-619.