

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

"OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE ESTRUCTURAS DE  
ANDAMIAJES POROSOS A PARTIR DE QUITOSANA  
Y DERIVADOS"

POR:

**SARIBEL FÉLIX FÉLIX**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIAD UNIDAD GUAYMAS EN ASEGURAMIENTO  
DE CALIDAD Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

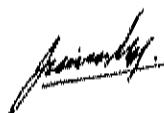
MAESTRÍA EN CIENCIAS

## APROBACIÓN

Los miembros del Comité designados para evaluar la Tesis titulada "Obtención y Evaluación de Estructuras de Andamiajes Porosos a partir de Quitosana y Derivados" realizada por la Ing. Saribel Félix Félix, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



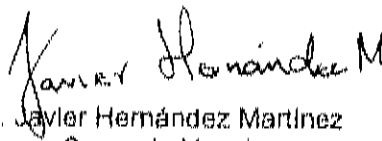
Dr. Waldo M. Argüelles Monal  
Presidente



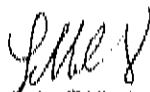
Dr. Jaime Lizardi Mendoza  
Secretario



Dr. Francisco M. Goycoolea Valencia  
Primer Vocal



Dr. Javier Hernández Martínez  
Segundo Vocal




M.C. Leticia Félix Valenzuela  
Tercer Vocal

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el 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 Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación de comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar crédito a CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de la tesis.



Dr. Alfonso Antero Gardea Béjar  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

*Principalmente, le doy gracias a Dios por permitirme cumplir una meta tan importante en mi vida.*

*Mi sincero agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Este trabajo se realizó con financiamiento de los proyectos de Ciencia Básica SEP-CONACYT 43450 Q y 61252, además por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de Maestría.*

*Al Centro de Investigación y Desarrollo A. C., especialmente al Dr. Waldo Manuel Argüelles Monal por su apoyo incondicional, paciencia y por saber guiar exitosamente este trabajo de investigación.*

*A los demás miembros de mi comité: Dr. Francisco M. Goycoolea Valencia, Dr. Jaime Lizardi Mendoza, Dr. Javier Hernández Martínez y M. C. Leticia Félix Valenzuela, por su confianza e importantes aportaciones en la realización de este trabajo.*

*Al Proyecto Alfa "POLYLIFE" (II-0259-FA-FCD) por el apoyo económico brindado para mi asistencia al curso de "Biopolymers in Materials and Life Sciences", en Potsdam, Alemania (Sep-2006).*

*A las Q. B. Luisa Lorena Silva Gutiérrez, Alma Consuelo Campa Mada y Karla Guadalupe Martínez Robinson por su apoyo, ayuda técnica y administrativa brindada durante este tiempo.*

*Al Dr. Julio San Román por su apoyo en la etapa de la Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM).*

*A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biopolímeros: Maricarmen, Adriana, Aarón, Yeren, Verónica, Saraí, Bibiana, Erika y Yolanda, por su paciencia y apoyo incondicional.*

*A toda mi familia, a la cual realmente amo, por el apoyo y confianza.*

*A mis amigos incondicionales, Edith, Tania y Norberto.*

*Y a quienes me acompañaron durante algo tan importante en mi vida, y en el día más difícil (el día de mi Defensa de Grado), especialmente a mi primo Iván.*

## DEDICATORIAS

*Con todo mi amor*

*A Dios*

*A mis padres que amo con toda mi alma, José Rosario y Marla Enriqueta*

*A mis hermanos que tanto quiero, José Enrique, Anna Karen y Brenda Isabel*

*A mis abuelos que tanto adoro y extraño, Enriqueta, Jesús, Elvira y Santiago*

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	3
Hipótesis.....	3
Objetivo general.....	3
Objetivos particulares.....	3
ANTECEDENTES.....	4
Hidrogeles para la ingeniería de tejidos.....	4
Quitosa.....	7
<i>Obtención de la quitosa</i> .....	8
<i>Condiciones de reacción</i> .....	9
<i>Geles de quitosa</i> .....	10
Geles de quitosa/genipina.....	11
Mecanismo de reticulación de la genipina.....	12

Aplicaciones biomédicas de la quitosana .....	13
<i>Biodegradabilidad de la quitosana</i> .....	14
<i>Biocompatibilidad de la quitosana</i> .....	15
<i>Qs en andamiajes poliméricos</i> .....	15
Fluidos supercríticos .....	17
<i>Polímeros procesados con FSCs</i> .....	18
<i>FSCs en andamiajes poliméricos</i> .....	21
<i>FSCs y quitosana</i> .....	21
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
Materiales y reactivos .....	23
Obtención de la quitosana .....	23
Purificación de la quitosana .....	24
Caracterización de la quitosana .....	24
<i>Grado de acetilación</i> .....	24
<i>Peso molecular promedio viscosimétrico (Mv)</i> .....	25
Membranas de quitosana .....	25
Síntesis del copolímero de quitosana injertado con N-isopropil acrilamida .....	26
Geles de quitosana y del copolímero .....	26
Acondicionamiento de los geles para su posterior tratamiento con CO <sub>2</sub> supercrítico .....	27
Elaboración de estructuras porosas por extracción supercrítica .....	27

Caracterización fisicoquímica .....	27
<i>Estudios de hinchamiento</i> .....	27
<i>Determinaciones microcalorimétricas</i> .....	28
<i>Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM)</i> .....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
Obtención y purificación de la quitosana .....	29
Caracterización de la quitosana .....	29
Membranas de quitosana .....	34
Geles de Quitosana/Genipina .....	39
Geles del Copolímero injertado de quitosana con N-isopropil acrilamida .....	40
Elaboración de estructuras porosas con CO <sub>2</sub> supercrítico .....	41
Caracterización fisicoquímica de los Andamiajes .....	42
<i>Estudios de hinchamiento</i> .....	42
<i>Estudios de termosensibilidad</i> .....	47
<i>Estudios de hinchamiento a diferentes pH</i> .....	49
<i>Reversibilidad de la transición térmica</i> .....	52
<i>Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM)</i> .....	56
CONCLUSIONES .....	60
RECOMENDACIONES .....	61



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química de la quitosana.....	8
<b>Figura 2.</b> Estructura química de la genipina.....	12
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de reticulación de la quitosana/genipina.....	13
<b>Figura 4.</b> Diagrama de fases presión-temperatura para materiales puros.....	17
<b>Figura 5.</b> Esquema del efecto del CO <sub>2</sub> sc en los polímeros cristalinos.....	19
<b>Figura 6.</b> Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental FEI Quanta 200.....	28
<b>Figura 7.</b> Curva de las valoraciones potenciométricas de las soluciones de Quitosana (sln 1 y sln2) con NaOH 0.1 mol·L <sup>-1</sup> .....	30
<b>Figura 8.</b> Curva de valoraciones conductimétricas de las soluciones de Quitosana (sln 1 y sln 2) con NaOH 0.1 mol·L <sup>-1</sup> .....	31
<b>Figura 9.</b> Gráfico de $\eta_{red}$ frente a $c$ para la muestra de Quitosana a 25°C disuelta en el sistema disolvente propuesto por Rinaudo y col. [81].....	33
<b>Figura 10.</b> Proceso de hinchamiento de membranas de quitosana (500 $\mu$ m) en H <sub>2</sub> O y en etanol a 25°C. Los puntos corresponden a los valores experimentales y los trazos al ajuste de los mismos a la ecuación (8).....	35
<b>Figura 11.</b> Proceso de hinchamiento de membranas de quitosana (500 $\mu$ m) en H <sub>2</sub> O y en etanol a 40°C. Los puntos corresponden a los valores experimentales y los trazos al ajuste de los mismos a la ecuación (8)....	36
<b>Figura 12.</b> Proceso de hinchamiento de membranas de quitosana (500 $\mu$ m) a 25°C en H <sub>2</sub> O y cambiadas a etanol.....	37

<b>Figura 13.</b> Ajuste de los datos experimentales del hinchamiento de una película de quitosana en agua a 25°C a la ecuación (8) por mínimos cuadrados no-lineales.....	38
<b>Figura 14.</b> Andamiajes obtenidos después del proceso de ESC, a la izquierda andamiaje de Quitosana (R=0.05) y a la derecha del copolímero Quitosana-g-NIPA (R=0.5).....	42
<b>Figura 15.</b> Hinchamiento de andamiajes porosos de quitosana y quitosana-g-NIPA (R = 0.5 y 0.05) en agua a 25°C.....	43
<b>Figura 16.</b> Ajuste a la ecuación (9) de los datos experimentales del hinchamiento en agua de los andamiajes de quitosana, a diferentes temperaturas: A-10; B-35 y C-70 °C .....	44
<b>Figura 17.</b> Ploteo de Arrhenius de la dependencia del coeficiente de difusión con la temperatura para andamiajes de quitosana en agua.....	46
<b>Figura 18.</b> Curvas de hinchamiento sucesivo de un mismo andamiaje de quitosana en agua a 25°C.....	47
<b>Figura 19.</b> Curvas micro-DSC de andamiajes de quitosana (R=0.05) y quitosana-g-NIPA (R=0.5) hinchados previamente en agua a 25°C, durante un calentamiento controlado (0.6°C/min). El valor de entalpía está expresado por gramo de andamiaje hinchado a 25°C.....	48
<b>Figura 20.</b> Reversibilidad en el hinchamiento en agua de andamiajes del copolímero quitosana-g-NIPA (R = 0.05) ante cambios de temperatura entre 25 y 45°C, en ciclos de 120 minutos cada uno.....	49
<b>Figura 21.</b> Curvas de hinchamiento a diferentes pH del copolímero quitosana-g-NIPA (R = 0.05) a temperatura de 25°C.....	50
<b>Figura 22.</b> Curvas micro-DSC durante un calentamiento controlado (0.6°C/min) de andamiaje de Quitosana-g-NIPA (R = 0.05) hinchado directamente en	

agua, HCl 0.1 M y NaOH 0.1M a 25°C. El valor de entalpía está expresado por gramo de andamiaje hinchado a 25°C.....51

**Figura 23.** Curvas micro-DSC durante un calentamiento controlado (0.6°C/min) de andamiaje de Quitosana-g-NIPA (R = 0.5) hinchado en agua a 25°C e intercambiado a NaOH 0.1M y HCl 0.1M, sin secar. El valor de entalpía está expresado por gramo de andamiaje hinchado a 25°C.....52

**Figura 24.** Curvas micro-DSC de andamiaje Quitosana-g-NIPA (R = 0.5) previamente hinchado en H<sub>2</sub>O a 25°C, durante 4 ciclos de calentamiento-enfriamiento. El valor de entalpía está expresado por gramo de andamiaje hinchado a 25°C.....53

**Figura 25.** Curvas micro-DSC de andamiaje Quitosana-g-NIPA (R = 0.05) previamente hinchado en H<sub>2</sub>O a 25°C, durante 4 ciclos de calentamiento-enfriamiento. El valor de entalpía está expresado por gramo de andamiaje hinchado a 25°C.....54

**Figura 26.** Curvas micro-DSC de andamiaje Quitosana-g-NIPA (R = 0.05) previamente hinchado en HCl 0.1M a 25°C, durante 3 ciclos de calentamiento-enfriamiento. El valor de entalpía está expresado por gramo de andamiaje hinchado a 25°C.....55

**Figura 27.** Curvas micro-DSC de andamiaje Quitosana-g-NIPA (R = 0.05) previamente hinchado en NaOH 0.1M a 25°C, durante 3 ciclos de calentamiento-enfriamiento. El valor de entalpía está expresado por gramo de andamiaje hinchado a 25°C.....56

**Figura 28.** Fotografías obtenidas a partir de la ESEM de los andamiajes de quitosana ( $R = 0.05$ ) a resoluciones de (a) 1 mm; (b) 500 $\mu$ m; (c) 200  $\mu$ m; (d) 100  $\mu$ m; (e) 50  $\mu$ m.....58

**Figura 29.** Fotografías obtenidas a partir de la ESEM de los andamiajes de Quitosana-g-NIPA ( $R=0.5$ ) a resoluciones de (a) 1 mm; (b) 500  $\mu$ m; (c) 100  $\mu$ m.....59

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características de la Quitosana obtenida en planta piloto de CIAD.....	34
<b>Tabla 2.</b> Resultados de las pruebas de hinchamiento de las membranas de quitosana a diferentes temperaturas.....	39
<b>Tabla 3.</b> Tiempos de extracción supercrítica a los que fueron expuestos los diferentes alcogeles de Quitosana.....	41
<b>Tabla 4.</b> Hinchamiento máximo ( $W_{max}$ ) y coeficiente de difusión ( $D$ ) para andamiajes de Quitosana durante el hinchamiento en agua a diferentes temperaturas.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>c</i>	Concentración
CO <sub>2</sub> sc	Dióxido de carbono supercrítico
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
<i>D</i>	Coefficiente de difusión
ESC	Extracción Supercrítica
ESEM	Microscopía electrónica de barrido ambiental
FSCs	Fluidos supercríticos
GAG	Glicosaminoglicanos
Gnp	Genipina
MEC	Matriz extracelular
micro-DSC	Microcalorimetría de barrido diferencial
NAC	Nitrato de amonio cérico
NIPA	N-Isopropilacrilamida
<i>P<sub>c</sub></i>	Presión crítica
Qs	Quitosa
R	Relación en peso de entrecruzante (Gnp) por gramo quitosa
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
sln	Solución
<i>T<sub>c</sub></i>	Temperatura crítica
Tg	Temperatura de transición vítrea
W	Hinchamiento expresado en gramos de disolvente por gramo de polímero

## RESUMEN

La preparación de andamiajes poliméricos porosos con fines biomédicos es un área de desarrollo vertiginoso en los últimos años, para lo cual es necesario que los polímeros que se utilicen sean biodegradables y biocompatibles. Al mismo tiempo se debe señalar que la utilización de polímeros naturales para generar materiales inteligentes es un campo que ha atraído mucho la atención en los últimos años. El objetivo principal de esta tesis fue generar estructuras porosas interconectadas, a partir de hidrogeles a base de quitosana y del copolímero quitosana-g-NIPA, utilizando la tecnología de extracción supercrítica y evaluar las propiedades de los materiales obtenidos.

En la primera etapa de este trabajo se realizaron estudios de hinchamiento comparativo de membranas de quitosana en agua y etanol, mismos que mostraron que el hinchamiento en agua es mayor que en etanol, lo cual está favorecido por las interacciones de largo alcance. Al momento de cambiar la membrana hinchada en agua a etanol ésta se contrae.

Con el empleo de la técnica de extracción supercrítica, se pudo obtener andamiajes porosos a partir de alcogeles de quitosana y del copolímero quitosana-g-NIPA entrecruzados covalentemente con genipita. La caracterización de estos materiales se llevó a cabo mediante estudios de hinchamiento, determinaciones microcalorimétricas y microscopía electrónica de barrido diferencial.

La dependencia con la temperatura del coeficiente de difusión del hinchamiento de los andamiajes de quitosana con una relación tipo Arrhenius mostró la existencia de dos energías de activación (14.7 y -6.6 kJ/mol a bajas y altas temperaturas, respectivamente), lo que indica un cambio abrupto a temperaturas por encima de

35°C, lo cual debe ser producto de la aparición de un proceso diferente al de difusión.

Los andamiajes del copolímero quitosana-g-NIPA mostraron, simultáneamente, sensibilidad al pH del medio y a la temperatura. Se observó que con la neutralización de la cadena ocurre un desplazamiento de la temperatura de transición hacia temperaturas más bajas. La transición de fases va acompañada de una contracción en el hinchamiento del andamiaje poroso y tiene un carácter reversible independientemente del pH del medio.

Ensayos de reversibilidad mediante microcalorimetría, mostraron que la transición en los andamiajes del copolímero es totalmente reversible, lo cual coincide con los resultados de estudios de hinchamiento, lo cual confirma los resultados calorimétricos.

Mediante ciclos sucesivos de calentamiento-enfriamiento en el calorímetro se verificó la reversibilidad de los andamiajes hinchados previamente en los diferentes medios, en general, todos estos experimentos mostraron que la transición térmica en los andamiajes del copolímero son prácticamente reversibles, sin que se aprecie ninguna diferencia significativa en cuanto a la temperatura de la transición, ni la entalpía asociada para los tres medios ensayados.

La morfología de los andamiajes de quitosana secos exhibió que el material obtenido tiene una microestructura fina de alta calidad con muy poca porosidad, además se observa que el andamiaje de quitosana exhibe una cierta porosidad en su superficie exterior, mientras que los andamiajes del copolímero exhibieron un estructura ligeramente más densa que los anteriores debido a la mayor densidad de entrecruzamiento con que se preparó la muestra.



## INTRODUCCIÓN

Cada año, millones de pacientes en el mundo sufren la pérdida o falla de algún órgano o tejido como consecuencia de enfermedades o accidentes. Generalmente el trasplante de órganos es la terapia aceptada para el tratamiento de estos pacientes. Sin embargo, ésta se ve severamente limitada por la disponibilidad de donadores, la cual es escasa con respecto al número de pacientes que podrían beneficiarse. Igualmente, son muchos los pacientes que cada año requieren injertos de piel para tratamiento de quemaduras severas y cáncer de piel [1]. Es por ello que es necesario implementar una alternativa de regeneración de tejidos para combatir la falta de donadores. Una opción viable son, los andamiajes de diversos materiales biodegradables y biocompatibles.

Un buen material de soporte para andamiajes de regeneración de tejidos debe interaccionar favorablemente con las células y con el medio, además, debe ser biodegradable y permitir la fácil preparación de soportes adecuados como los sistemas tridimensionales porosos con espacios interconectados. En este sentido, se requiere de hidrogeles que puedan procesarse ya sea en forma de fibras o espumas, lo que constituye una línea de intensa investigación en el campo de los nuevos materiales, en especial de los biomateriales. Para poder controlar sus propiedades son necesarios sistemas *inteligentes* que den respuesta a cambios en las condiciones del ambiente.

La quitina y la quitosana (Qs) son excelentes candidatos para la fabricación de andamiajes porosos, ya que cuentan con las propiedades necesarias para un buen material de soporte. Una de las características más útiles de la Qs es su capacidad para ser procesada en condiciones suaves de temperatura y presión

para formar estructuras gelificadas para su uso como sistemas de andamiaje. Además de las ventajas estructurales, la quitosana es un material biocompatible y biodegradable.

En esta investigación se pretende desarrollar un gel de Qs para la elaboración de andamiajes porosos utilizando la técnica de extracción supercrítica (ESC), la cual se ha empleado con resultados sobresalientes en la ingeniería de materiales porosos construidos a base de diversos polímeros sintéticos, como el polimetilmetacrilato, polietilmetacrilato, policarbonato, poliestireno, poliéster, poliláctico, etc [2]. Esta técnica prácticamente no se ha explorado para procesar materiales a base de biopolímeros, como la quitina y Qs. En este hecho estriba una de las principales aportaciones del presente trabajo de investigación.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis

Se obtendrán andamiajes porosos a partir de geles de quitosana y del copolímero quitosana-g-NIPA, utilizando la tecnología de extracción supercrítica.

### Objetivo general

Generar estructuras porosas interconectadas, a partir de hidrogeles a base de quitosana y del copolímero quitosana-g-NIPA, utilizando la tecnología de extracción supercrítica y evaluar las propiedades de los materiales obtenidos.

### Objetivos particulares

1. Obtener membranas de quitosana y evaluar sus propiedades de hinchamiento.
2. Obtener andamiajes porosos a partir de geles químicos de quitosana y del copolímero quitosana-g-NIPA entrecruzados covalentemente con genipina.
3. Caracterizar las propiedades térmicas, de hinchamiento y morfología en los andamiajes porosos obtenidos.

## ANTECEDENTES

### Hidrogeles para la Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es una disciplina que se basa en el desarrollo de sustitutos que reparen, mantengan y mejoren las funciones de un tejido, combinando los principios de la ingeniería y de las ciencias de la salud. Un buen material de soporte como andamiajes en los que van a crecer las células debe interactuar favorablemente con las mismas y con el medio, y, además, debe de ser preferentemente biodegradable. El principal objetivo de un andamiaje es la completa regeneración del tejido y debe permitir la fácil preparación de soportes adecuados como los sistemas tridimensionales porosos con espacios interconectados. Estas propiedades pueden ser completadas con una estimulación activa del proceso regenerativo mediante la dosificación controlada de ciertos factores de crecimiento.

La Qs es un excelente candidato para este fin, puesto que reúne muchas de estas características. Además posee cationicidad –que está asociada a algunos de los comportamientos o respuestas biológicas-, también tiene facilidad de manipulación, es por ello que se ha despertado interés en este campo.

Las unidades estructurales de la Qs, la glucosamina y la N-acetil-glucosamina, están presentes en diferentes glicosaminoglicanos (GAG). Estos compuestos son heteropolisacáridos lineales y aniónicos presentes en las matrices extracelulares de los tejidos humanos. En su estado natural, varios GAG se encuentran unidos covalentemente a proteínas y forman los proteoglicanos, que

juegan un papel muy importante en la organización y funcionamiento de la matriz extracelular. La Qs es, por lo tanto, un compuesto análogo a los GAG, y eso le confiere alguna de sus actividades biológicas. Pero, además, a diferencia de los GAG aniónicos (p. ej. colágeno y ácido hialurónico), la Qs presenta carácter básico y carga positiva a pH ácido; por ello, puede interactuar con las superficies celulares y proteínas plasmáticas de manera singular, combinando interacciones específicas tipo GAG con otras inespecíficas asociadas a su carga [3].

Una de las características más útiles de la Qs es su capacidad de ser procesada en condiciones suaves de temperatura y presión para formar estructuras adecuadas para su uso como sistemas de andamiaje. Entre otras, cabría destacar la sencilla obtención de estructuras porosas mediante un método de separación de fases [3].

Una práctica novedosa para el tratamiento de pacientes que requieren de un nuevo órgano o tejido es la ingeniería de órganos y tejidos a base de materiales confeccionados por el hombre. Para este fin se han empleado tres principales métodos [4]. En el primer método, un *andamiaje polimérico* es producido con la forma del órgano a ser remplazado. Células viables propias de dicho órgano se siembran en este material y se cultivan *in vitro*. Este proceso eventualmente produce un tejido es decir, un ensamble de células organizado y funcional. A medida que las células crecen el andamiaje se degrada, preferentemente a una velocidad controlada, liberando materiales inocuos, hasta que eventualmente sólo el tejido permanece. Por tanto, en un sistema ideal, un nuevo tejido se habrá producido a partir de un pequeño número de células. Este tejido puede ser entonces implantado para remplazar el tejido dañado o enfermo, o teóricamente podría combinarse con otros tejidos para producir un órgano. En la segunda variante, el andamiaje se siembra inicialmente con las células apropiadas *in vivo*. Este andamiaje es luego implantado en el órgano de tal manera que el crecimiento celular esté determinado por los mecanismos de control naturales

del cuerpo. Por tanto, las células crecen y se proliferan bajo la influencia de los factores de crecimiento propios del cuerpo y otras moléculas de señalización. Una vez que las células crecen y el tejido se desarrolla, el andamiaje se degrada cediendo paso a la biosíntesis de matriz extracelular. En este caso es aún más importante que los productos de degradación no sean tóxicos. Otra forma de conseguir la ingeniería de tejidos *in vivo*, es implantando el andamiaje y luego dejando que las células del paciente lo colonicen, crezcan y se multipliquen [4].

Bajo los anteriores métodos experimentales, las células viables se multiplican en matrices extracelulares de naturaleza polimérica, de origen natural o sintético. Estos sistemas de andamiaje se encargan de incorporar células específicas del tejido en una malla macromolecular tridimensional, los cuales deben interaccionar favorablemente con las mismas y con el medio, y además, deben ser biodegradables y proveer un espacio para la regeneración de tejido nuevo y controlar potencialmente la estructura y función de éste. La matriz macromolecular constituye una barrera física que permita la difusión controlada de metabolitos (nutrientes y sustancias de desecho) [5,6]. De esta forma, se ha conseguido la ingeniería de una variedad de tejidos, que incluye piel, cartilago, hueso, ligamento y tendón [7].

Desde el punto de vista de la ciencia de materiales, un buen material de soporte para utilizarse como andamiaje de regeneración de tejidos, debe interaccionar favorablemente con las células y con el medio, debe ser biodegradable y debe permitir la fácil preparación de soportes adecuados como los sistemas tridimensionales porosos con poros interconectados. En este sentido, se requiere de hidrogeles que puedan procesarse ya sea en forma de fibras y esponjas de porosidad y otras propiedades físicas controladas, lo que constituye una línea de intensa investigación en el campo de los nuevos materiales.

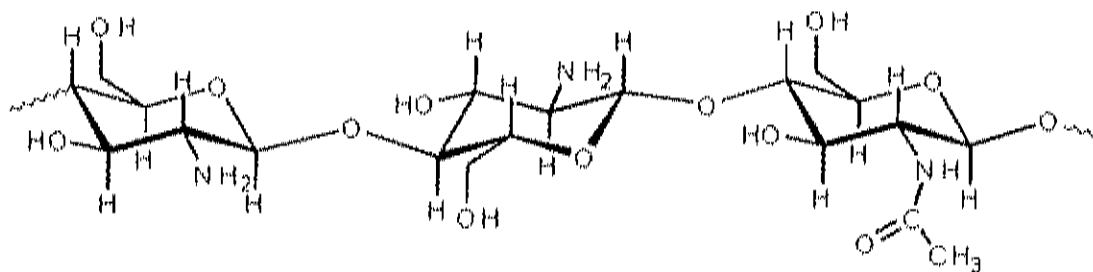
A su vez, estrategias de modificaciones y rutas de proceso imaginativos definitivamente son clave en la investigación en este campo. Por ejemplo, la estructura del colágeno puede ser mimetizada en varias formas, que incluyen

hidrogeles que contienen dominios hidrofóbicos que actúan como entrecruzadores físicos [8].

La estructura polimérica en un andamiaje para ingeniería de tejidos potencialmente simula muchas de las funciones de la matriz extracelular encontrada en los diversos tejidos. Compuesta de varios tipos de macromoléculas (proteoglicanos y glicosilaminoglicanos), la matriz extracelular (MEC) se encarga de soportar las células y de controlar la estructura del tejido, regular la función de las células, y permitir la difusión de nutrientes, metabolitos, y factores de crecimiento [9]. Sin duda, la guía principal para el diseño de andamiajes es mimetizar la MEC. Desde un enfoque físico, la MEC es esencialmente un hidrogel entrecruzado compuesto principalmente por agua y en el cual, por ejemplo, el ácido hialurónico actúa como polímero hidrofílico y el colágeno como entrecruzante y elemento de reconocimiento. De aquí que los hidrogeles a base de polímeros naturales sean los materiales candidatos ideales para desarrollar nuevos andamiajes.

### Quitosa

La Qs es un polisacárido formado por cadenas con distintas proporciones de unidades  $\beta$ -(1,4)-2-acetamido-2-deoxi-D-glucosa y  $\beta$ -(1,4)-2-amino-2-deoxi-D-glucosa, en donde predomina la unidad glucosamina (Fig. 1) [10]. Es soluble en medios ligeramente ácidos y tiene la propiedad de ser inocuo, biocompatible y biodegradable, por lo que ha atraído enorme interés para emplearse en alimentos, biomedicina, control ambiental y química analítica [3, 11].



**Figura 1.** Estructura química de la quitosana.

### *Obtención de la quitosana*

La principal reacción de derivatización de la quitina es la hidrólisis extensiva de los grupos acetamido para generar un polímero desacetilado Qs. Aunque las amidas, en principio, pueden hidrolizarse bajo condiciones ácidas o alcalinas, se excluye el uso de hidrólisis ácida debido a la susceptibilidad a la misma de los enlaces glicosídicos de la quitina. Esta reacción se conduce bajo condiciones alcalinas muy severas, debido a la combinación de tres factores: 1) la baja reactividad debida a configuraciones *trans* de los sustituyentes acetamida con respecto al grupo OH-3 del anillo piranósico de la unidad monomérica [12]; 2) la presencia de puentes de hidrógeno entre unidades estructurales adyacentes; y 3) el denso empaquetamiento de las cadenas en el enrejado cristalino de la quitina, que previene el acceso del álcali a los sitios reactivos. Normalmente, son necesarios tratamientos térmicos de la quitina en soluciones básicas muy concentradas con el objetivo de desacetilar parcialmente el polímero y obtener Qs. La desacetilación completa difícilmente se alcanza y normalmente no es necesaria, ya que la solubilidad en soluciones de ácido diluido se logra a partir de un grado de desacetilación de ~60%. El criterio utilizado para distinguir entre quitina y Qs es precisamente la solubilidad de esta última en soluciones de ácido diluido. La Qs, por lo tanto, no es una entidad química única y definida, sino que designa a una familia de polisacáridos que varían entre sí en su composición y



tamaño molecular. Esta variabilidad se asocia especialmente a las condiciones del proceso de obtención.

### *Condiciones de reacción*

En la desacetilación, las condiciones de reacción se seleccionan de manera tal que se obtenga un nivel de conversión suficiente en un tiempo razonable y se origine un producto soluble en disoluciones ácidas diluidas sin que haya una degradación significativa de la cadena polimérica.

La conversión de quitina en Qs se logra generalmente por medio de un tratamiento de la quitina con soluciones concentradas de hidróxido de sodio o de potasio (al 30-50% p/p), a temperaturas que oscilan cerca del punto de ebullición de la solución de álcali ( $> 100^{\circ}\text{C}$ ). Típicamente, la reacción se efectúa en un recipiente con agitación en donde la quitina se mantiene suspendida en la solución concentrada de álcali y con atmósfera de  $\text{N}_2$  o argón. Los vapores generados son condensados y recirculados al reactor o por medio de una columna con reflujo. La quitina se mantiene en suspensión hasta que el grado de desacetilación alcanzado produce Qs; obteniéndose como subproducto acetato de sodio. Por tratarse de una reacción en fase heterogénea, se requiere un nivel adecuado de agitación para obtener un medio de reacción y un producto uniforme. Para obtener esa condición, se opera con relaciones sólido-líquido del orden de 1:5 a 1:15 –expresadas en peso a volumen-.

De acuerdo con Rigby [13], los factores que afectan el grado de desacetilación son la concentración del álcali, los tratamientos previos, el tamaño de partícula y la densidad –y, por lo tanto, la porosidad- de la quitina. Estos dos últimos factores afectan la velocidad de la penetración del álcali en las regiones amorfas del polímero y, en cierta medida, también en las regiones cristalinas, lo que es necesario para que tenga lugar la hidrólisis [14].

### *Geles de quitosana*

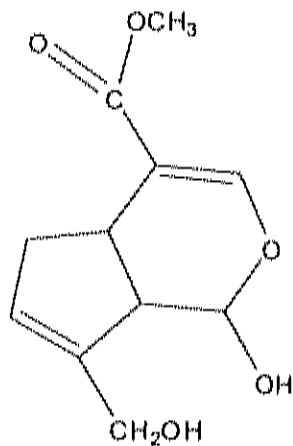
Los geles a partir de polímeros naturales han recibido una gran atención en los últimos años. Estos geles muestran nuevas propiedades fisicoquímicas, particularmente en sistemas acuosos, teniendo gran importancia en aplicaciones avanzadas, particularmente en alimentos, cosméticos, medicina y biotecnología. Sin embargo, los mecanismos fundamentales que operan en estos geles son todavía poco entendidos en la mayoría de los casos, debido a la alta dispersión intrínseca (en el tamaño de la cadena y composición química), en comparación con sus contrapartes sintéticas [15].

Los hidrogeles son redes poliméricas entrecruzadas hidrofílicamente que pueden absorber grandes cantidades de agua dentro de su estructura, sin que ocurra la disolución. Debido a su gran contenido de agua y buena compatibilidad, los hidrogeles tienen una amplia gama de aplicaciones biomédicas y biotecnológicas que se han estudiado, incluyendo sistemas de liberación controlada [16-18], lentes de contacto [19], curación de heridas [20], y una gran variedad de otros usos potenciales. Mucha atención se ha enfocado especialmente sobre los geles que presentan respuesta a estimulaciones y que pueden exhibir cambios importantes en su comportamiento de hinchamiento, estructura de la red, o fuerza mecánica en respuesta al cambio de pH [21, 22], temperatura [23], campo eléctrico [24], y fuerza iónica [25].

Por su naturaleza policatiónica, la Qs ha sido empleada en la síntesis de geles físicos y químicos [26, 27]. Los geles químicos son aquellos en los que la red está formada a través de enlaces covalentes irreversibles entre un agente entrecruzante y las cadenas del polímero. Los geles físicos, son redes tridimensionales, desordenadas y continuas que se forman por interacciones no covalentes entre las cadenas poliméricas. Estas interacciones incluyen puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, asociaciones hidrofóbicas, entre otras [26-29].

Geles de quitosana/genipina. Muchas investigaciones recientes han tratado de mejorar las propiedades mecánicas y estabilidad de la Qs y materiales derivados de ésta [30-33]. Las alteraciones de la Qs en mezclas con otros polímeros [34, 35] y entrecruzantes [36, 37] son convenientes y efectivas en mejorar sus propiedades físicas y aplicaciones prácticas. El químico sintético más frecuentemente utilizado como entrecruzante es el glutaraldehído [36]. De igual forma, se pueden utilizar formaldehído [38], componentes epoxy [39], y almidón de dialdehído [40]. Sin embargo, todos estos agentes entrecruzantes son químicamente sintetizados y no están libres de los problemas causados por la toxicidad fisiológica [41, 42].

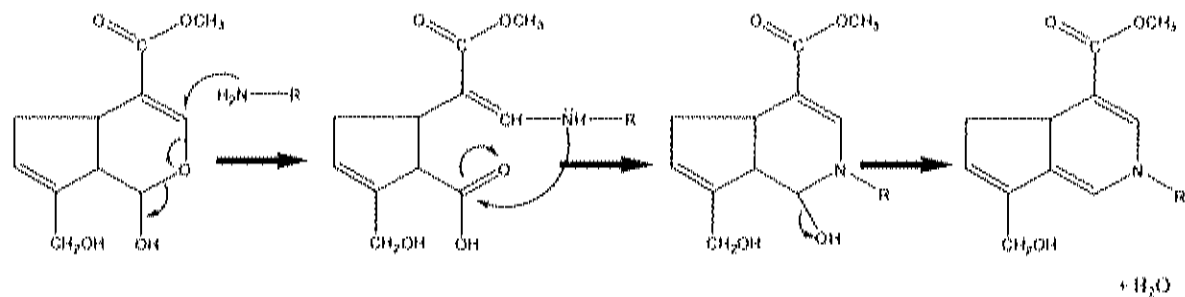
La genipina (Gnp) es usada en la medicina tradicional China y extraída de los frutos de Gardenia [47, 48]. Es importante señalar, que la Gnp supera el problema de la toxicidad fisiológica inherente al uso de algunos productos químicos sintéticos comunes como agentes entrecruzantes. Se ha reportado que la Gnp, cuya estructura química se muestra en la figura 2, es un agente entrecruzante natural y puede reaccionar espontáneamente con los aminoácidos o proteínas para formar un compuesto de coloración azul marino [43]. Sung y colaboradores [44-46] han emprendido estudios para investigar la citotoxicidad, viabilidad y biocompatibilidad de la Gnp para la fijación de tejidos. Los resultados de esos estudios [46] demostraron que la Gnp es 10,000 veces menos citotóxica que el glutaraldehído, esto es muy alentador para la investigación del uso de este agente para producir materiales para usos médicos.



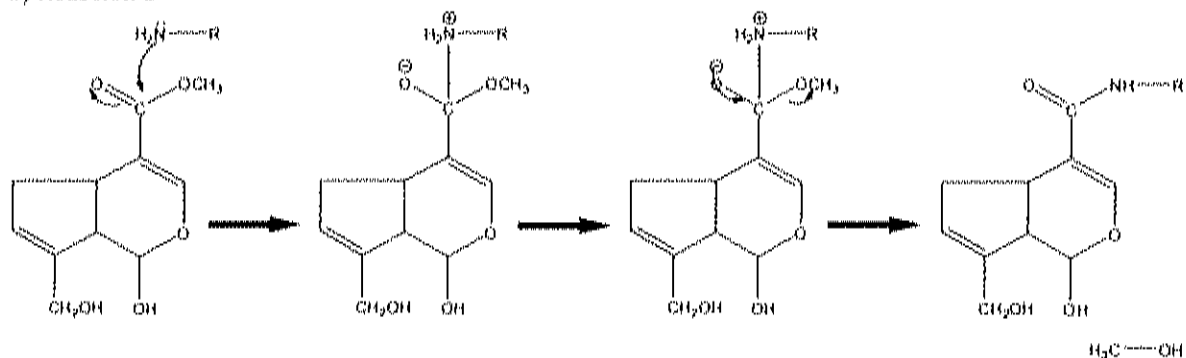
**Figura 2.** Estructura química de la genipina.

Mecanismo de reticulación de la genipina. El mecanismo de reticulación de la genipina se lleva a cabo mediante dos reacciones que ocurren a diferentes velocidades y que involucran diferentes sitios de la molécula de genipina. La primera y la más rápida, es el ataque nucleofílico del grupo amino del quitosano sobre el carbono olefínico C-3 de la aglicona de deoxiloganina, que permite la apertura del anillo dihidropirano y la formación de un anillo heterocíclico de genipina unida al residuo glucosamina en la quitosana (Figura 3a). La segunda reacción, más lenta, es la sustitución nucleofílica del grupo éster de la genipina para formar una amida secundaria con la quitosana y una molécula de metanol (Figura 3b) [45, 89].

a) Reacción 1



b) Reacción 2



**Figura 3.** Mecanismo de reticulación de la quitosana/genipina.

### *Aplicaciones biomédicas de la quitosana*

La Qs es un polímero muy interesante en el campo de los biomateriales, debido principalmente a su carácter biocompatible y a su baja toxicidad. Además, es biodegradable, lo que constituye un requisito necesario en numerosas aplicaciones biomédicas, como la preparación de diferentes soportes, andamiajes, cementos, encapsulados, entre otros, para la regeneración y reparación tisular (dada su afinidad celular y su biodegradabilidad).

Recientemente, la Qs ha atraído mucho la atención de los científicos en diferentes partes del mundo, debido a que es muy interesante para su uso como biomaterial [49-51] y como material funcional [52, 53]. Los grupos amino e hidroxilos de la quitosana permiten que sea químicamente fácil de modificar, es por ello que la Qs ofrece un sistema especial de características:

biocompatibilidad, biodegradabilidad, mucoadhesividad y propiedades antibacteriales [54, 55]. La Qs es también biológicamente inerte, segura para el uso humano, y estable en el ambiente natural [53, 56, 57]. Es por ello que todas estas características hacen a la quitosana apropiada para el uso de un gran número de aplicaciones biomédicas, incluyendo piel artificial, regeneración de tejidos, cicatrización de heridas y liberación controlada de fármacos [50, 58-60]. Es vital que para todas estas aplicaciones el material deba de ser demostrablemente no tóxico, en otras palabras, el polímero, sus posibles productos de la degradación, cualquier residuo monomérico, y todos los aditivos deben de ser libres de efectos dañinos.

#### *Biodegradabilidad de la quitosana*

Aunque la quitina y la Qs son macromoléculas totalmente ausentes en mamíferos, se degradan y reabsorben «in vivo». Esta característica y otras, como su biocompatibilidad y versatilidad, las hacen polímeros muy atractivos para aplicaciones biomédicas. Esta degradación se debe principalmente a la susceptibilidad de ser hidrolizados enzimáticamente por la lisozima, una enzima hidrolítica no específica presente en todos los tejidos del cuerpo humano – aunque también parece haber evidencias de la actividad hidrolítica de otras enzimas proteolíticas como pepsina, papaína o pancreatina—. La degradación de estos polímeros –vía lisozima– depende del grado de desacetilación. La Qs totalmente desacetilada no es sensible a la acción de esta enzima, mientras que la quitina o quitosanas parcialmente desacetiladas sí lo son [3].

De hecho, parece que son necesarias tres unidades consecutivas acetiladas para que el sustrato sea reconocido por la lisozima, aunque el mecanismo de la degradación no está completamente elucidado; el empaquetamiento cristalino y su influencia en la accesibilidad de la enzima también parecen ser importantes. En cualquier caso, polímeros altamente desacetilados se degradan –vía

lisozima— más lentamente que aquellos con bajos grados de acetilación. Además del grado de desacetilación, otros parámetros como el peso molecular, el pH o, incluso, el método de obtención influyen en la biodegradación [3].

La biodegradación mediante la acción de la lisozima produce oligosacáridos no tóxicos que pueden ser posteriormente degradados por otras enzimas; estos productos son eliminados o reabsorbidos fácilmente por el organismo. El estudio y análisis de los diferentes factores que afectan a la biodegradación es importante no solamente a la hora de elucidar si ésta tiene o no lugar, sino porque la velocidad de biodegradación definirá su funcionalidad en una aplicación concreta. Además esta velocidad de biodegradación también influirá en la biocompatibilidad, ya que una degradación demasiado rápida puede conducir una reacción inflamatoria aguda asociada a la acumulación de productos de degradación [3].

#### *Biocompatibilidad de la quitosana*

La quitina y la Qs se consideran polímeros de excelente y reconocida biocompatibilidad, aunque, en cualquier caso, la respuesta biológica de estos compuestos, así como cualquiera de sus propiedades, dependerá de sus características particulares, es decir, de su fuente y método de obtención, del peso molecular, del grado de desacetilación, etc. La mayoría de los estudios biológicos han sido llevados a cabo con quitosana(s) de alto grado de pureza antes que con quitina, debido a su mayor interés y versatilidad [3].

#### *Qs en andamiajes poliméricos*

La Qs es muy atractiva en el campo de los biomateriales debido a que es un polímero no tóxico, biodegradable, y biocompatible. Es un biopoliaminosacárido lineal natural derivado a partir de la desacetilación alcalina de la quitina, el

segundo biopolímero más abundante encontrado en la naturaleza después de la celulosa. La Qs es insoluble a valores de pH neutro y alcalino pero forma sales con ácidos inorgánicos y orgánicos como el ácido glutámico, ácido láctico, y ácido acético. Las sales de Qs son solubles en agua, la solubilidad comienza dependiendo del grado de acetilación y pH. Usualmente, el disolvente más comúnmente empleado para la quitosana son soluciones acuosas de ácido acético con concentraciones entre el 1 y 3%.

La Qs ha recibido gran atención como un material polimérico renovable, desde que ésta puede ser usada en muchos campos debido a su estructura química. Particularmente, propiedades tales como biodegradabilidad, baja toxicidad, y buena biocompatibilidad hacen a la Qs particularmente conveniente para usos biomédicos y farmacéuticos [60-62]. También se ha investigado extensamente en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos.

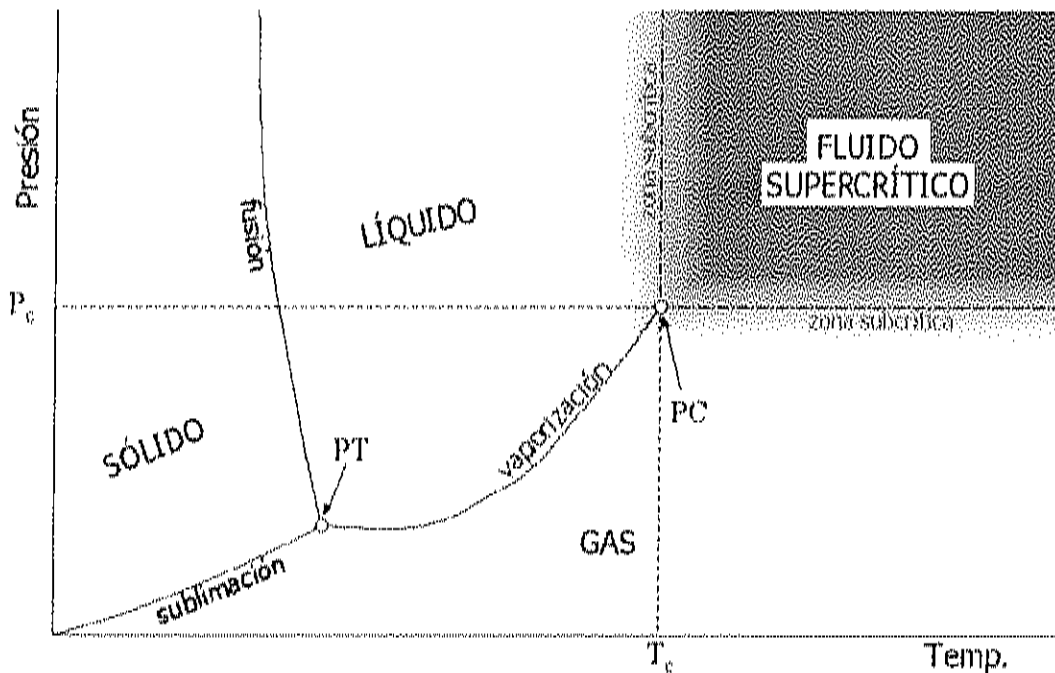
En 1999, Sundararajan y Howard [63] describieron la preparación y caracterización de andamiajes porosos de Qs para ser utilizados en ingeniería de tejidos. Por otra parte Zhao y colaboradores [64] prepararon un andamiaje tridimensional altamente poroso compuesto de un gel de quitosana/hidroxiapatita, ya que tiene una composición similar a la del hueso humano, lo cual lo hace útil en la ingeniería de tejidos. Los andamiajes con 90.6% de porosidad fueron utilizados para examinar la proliferación y funciones de las células en este microambiente tridimensional.

Por su parte Nakamatsu y colaboradores [66], investigaron el desarrollo de andamiajes con porosidad controlada para aplicaciones en ingeniería de tejidos usando quitina, quitosana y almidón. Éstos polímeros naturales y sus mezclas las compararon en términos de su procesabilidad, propiedades mecánicas, y biodegradabilidad. Éstos polímeros biodegradables fueron procesados por diferentes técnicas para la producción de estructuras porosas y obtuvieron estructuras con poros de un rango de 1 a 400  $\mu\text{m}$ .



## Fluidos supercríticos

El estudio de los fluidos supercríticos (FSCs) comenzó en el siglo XIX, pero fue hasta el siglo XX cuando los FSCs para los procesos químicos comenzaron a ser utilizados. Un fluido supercrítico es definido como una sustancia que se encuentra por encima de su temperatura y presión crítica [67]. La figura 4 muestra un diagrama de fases presión-temperatura para un fluido puro. En el diagrama también se muestran las líneas que indican la coexistencia de dos fases. La línea líquido-gas se extiende desde el punto triple hasta el punto crítico, donde las características del líquido y del vapor llegan a ser idénticas. La región representada por el estado de fluido supercrítico es mostrado con área sombreada.



**Figura 4.** Diagrama de fases presión-temperatura para materiales puros.

Un fluido supercrítico exhibe propiedades fisicoquímicas intermedias entre líquidos y gases, los cuales realizan su papel como solvente. En el caso del dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), las condiciones en las cuales se puede considerar un

fluido supercrítico son temperatura crítica  $T_c = 31.1^\circ\text{C}$ , y la presión crítica  $P_c = 73.8$  bar [68].

En años recientes, los FSCs han presentado gran interés como disolventes para las reacciones químicas, separación, y extracciones en el área de las investigaciones básicas, así como en procesos industriales. Especialmente, el dióxido de carbono supercrítico ( $\text{CO}_2\text{sc}$ ) es un reemplazo deseable de los disolventes orgánicos porque es barato, no tóxico, no inflamable, ambientalmente benigno, y facilita el reciclaje y su disponibilidad [69].

### *Polímeros procesados con FSCs*

Los FSCs tienen un único e invaluable potencial para el procesamiento de muchos materiales. Kazarian, en el 2000, reportó aplicaciones del procesamiento de polímeros con fluidos supercríticos. La habilidad del  $\text{CO}_2\text{sc}$  para hinchar y plastificar polímeros es crucial para la impregnación, extracción, y modificación de materiales poliméricos. Esta plastificación también reduce la viscosidad y facilita el procesamiento de polímeros debido a tensiones de deformación más bajas. La espectroscopia juega un rol muy importante en la investigación de esas interacciones a nivel molecular y para mostrar procesos *in situ* del  $\text{CO}_2$ -induciendo la plastificación y la cristalización de polímeros [67].

Los FSCs tienen propiedades únicas que pueden mejorar muchos tipos de operaciones del proceso químico. Una ventaja adicional para usar FSCs proviene del hecho de que pueden sustituir muchos solventes dañinos al medio ambiente usados actualmente en la industria. En particular, los FSCs representan una atractiva alternativa de los solventes orgánicos para el uso como aditivos en el procesamiento de polímeros. Por otra parte, el hecho de que el  $\text{CO}_2$  es un gas bajo condiciones ambientales hace que su eliminación del material polimérico sea muy fácil, evitando, por ejemplo, los procesos costosos

del secado o exclusión del solvente, que son muy importantes en el proceso de materiales basados en polímeros.

El procesamiento de materiales poliméricos con  $\text{CO}_2\text{sc}$  se basa fundamentalmente en el hecho de que la sorción del  $\text{CO}_2\text{sc}$  al polímero causa su hinchamiento y cambios en sus propiedades mecánicas y físicas. El efecto más importante es la reducción de la temperatura de transición vítrea,  $T_g$ , de polímeros en estado amorfo vítreo, a menudo conocido como *plastificación*. La plastificación tiene numerosas implicaciones en el proceso de polímeros, entre ellas la reducción en viscosidad y el aumento de la difusión de monómeros durante la síntesis. Además, su empleo resulta en la generación de estructuras porosas y en cambios en la morfología [67]. La plastificación se caracteriza por el incremento en la movilidad segmental y por un incremento en la distancia intercadenas. El efecto plastificante del  $\text{CO}_2$  se atribuye a su capacidad para interactuar con los sitios básicos en las moléculas de polímeros [70] (Fig. 5).

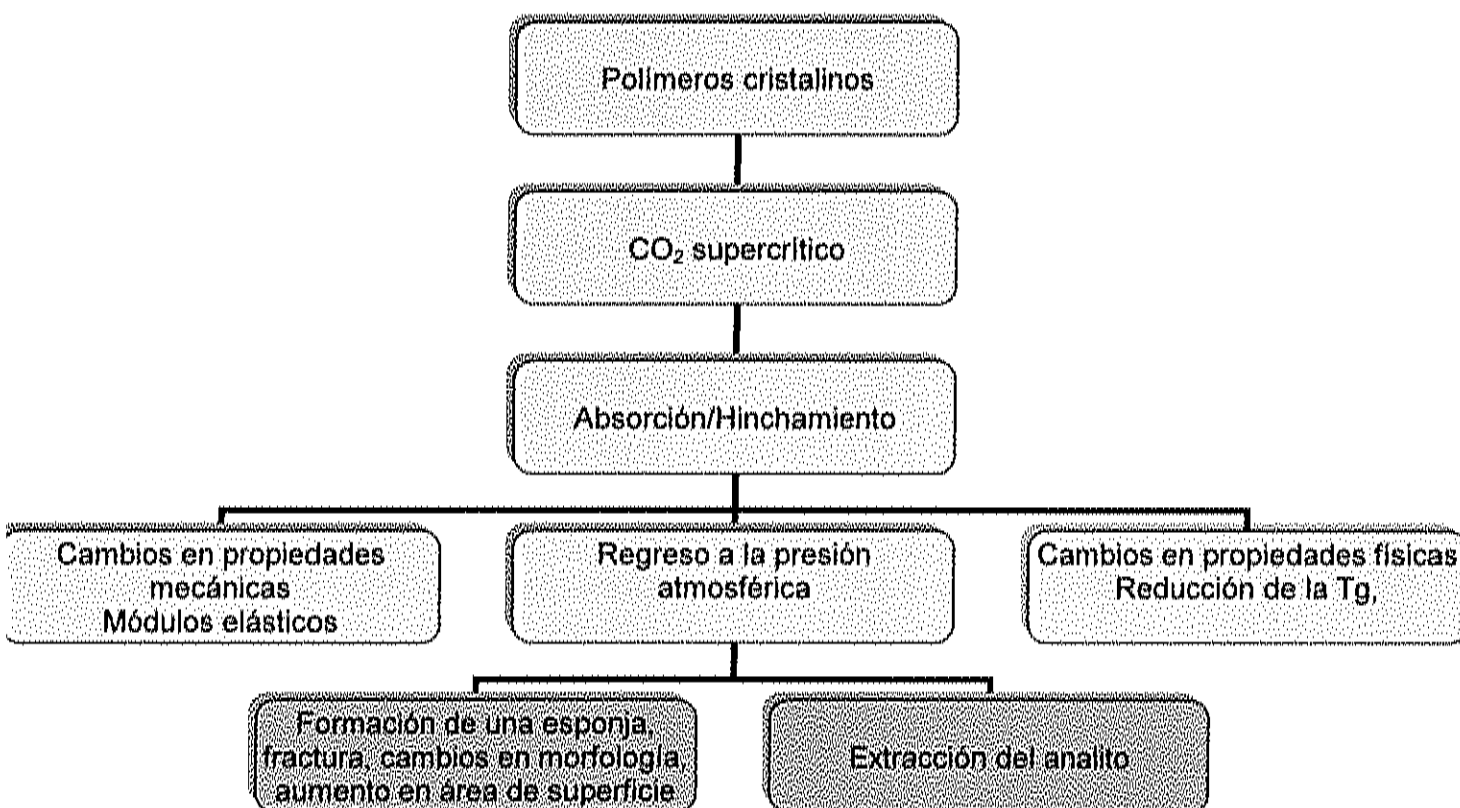


Figura 5. Esquema del efecto del  $\text{CO}_2\text{sc}$  en los polímeros cristalinos.

La plastificación de polímeros vítreos con FSC juega un papel muy importante en la formación de estructuras porosas poliméricas. Estas estructuras pueden tener propiedades superiores a las de los polímeros sin porosidad, por ejemplo, mayor fuerza de impacto y pueden encontrar aplicaciones como dispositivos biomédicos y adsorbentes. En términos generales, lo que sucede en la ESC es lo siguiente: cuando el polímero se somete a interactuar con un gas a alta presión, en este caso  $\text{CO}_2$ , después de un tiempo éste se hincha con el fluido supercrítico; pero si entonces la presión es disminuida rápidamente, se crea una inestabilidad termodinámica en el sistema polímero:gas fluidizado y el gas tratará de escapar del polímero. El rápido escape del gas del polímero ocasionará la nucleación y crecimiento de burbujas dentro del polímero.

Después de que una cantidad significativa de gas se ha escapado, la  $T_g$  del polímero baja y de esta forma la estructura porosa se "congela" [67]. El efecto plastificante del  $\text{CO}_2$  es el resultado de la habilidad de las moléculas del  $\text{CO}_2$  para interactuar con los sitios básicos en las moléculas del polímero. Por ejemplo, en 1996, Kazarian y colaboradores [71] demostraron que las interacciones entre el  $\text{CO}_2$  y los grupos funcionales reducen las interacciones cadena-cadena.

Aunque la tecnología de ESC se ha empleado con resultados sobresalientes en la ingeniería de materiales porosos construidos a base de diversos polímeros sintéticos (polimetilmetacrilato, polietilmetacrilato, policarbonato, poliestireno, poliéster, poliláctico, etc.) [67], prácticamente no se ha explorado para procesar materiales a base de biopolímeros.

### *FSCs en andamiajes poliméricos*

En el 2001, Howdle y colaboradores [72] reportaron el uso del CO<sub>2</sub>sc para crear una gama diversa de materiales poliméricos, en donde describen que las condiciones de presión y temperatura requeridas para plastificar el polímero son determinadas por la composición del polímero. Además la agitación eficiente del polímero hinchado con CO<sub>2</sub>sc conduce a la distribución homogénea de las partículas huéspedes a través de la matriz polimérica. La despresurización es rápida, y puede ser controlada por la acción de una válvula de vacío. La velocidad de despresurización influye enormemente en la porosidad y tamaño del poro [73, 74]. A una lenta despresurización (alrededor de 2 hr) se obtienen materiales que poseen una pequeña población de grandes poros (100-500µm), mientras que a una rápida despresurización se obtiene un material altamente poroso.

Es por ello, que Briones y colaboradores [77] demostraron que el uso de la tecnología del CO<sub>2</sub>sc conduce a un control fino sobre la morfología de los compuestos poliméricos, ya que con una despresurización lenta obtienen microporos entre 50 y 100 nm de diámetro y no se produjeron poros en el rango de 500 nm a 5µm. Inversamente, la despresurización rápida no produce microporos en el rango de 50-100 nm, pero si produce muchos en el rango de 500 nm a 5 µm. Entonces, la mezcla supercrítica ofrece un mecanismo para controlar la porosidad de macro y microporos en un solo paso [75].

### *FSCs y quitosana*

El procesamiento de la Qs utilizando la tecnología de FSCs ha sido estudiado por varios autores, sin embargo no hay mucho trabajo al respecto. Por ejemplo, las estructuras porosas de Qs se han obtenido usando el CO<sub>2</sub>sc [76]. En el 2006 Reverchon y Antonacci [65] prepararon micropartículas de quitosana procesadas

con fluidos supercríticos, donde confirmaron que es factible el uso de esta técnica para producir micropartículas esféricas bien definidas.

De hecho, la solubilidad de la Qs en  $\text{CO}_2\text{sc}$  es casi nula; por lo tanto, los procesos basados en el efecto solvente del  $\text{CO}_2$  no pueden ser aplicados con éxito. Por otra parte, desde que se utiliza la solución acuosa de ácido acético de 1 – 3% para solubilizar la Qs, procesos basados en el efecto antisolvente del  $\text{CO}_2$  no pueden ser utilizadas, puesto que el  $\text{CO}_2\text{sc}$  no es un solvente eficaz para soluciones acuosas [77].

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales y reactivos

La quitosana utilizada en este estudio fue obtenida en el Laboratorio de Biopolímeros del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD A.C.), Unidad Hermosillo, a partir de quitina aislada de cabezas de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) capturado en alta mar. La genipina fue suministrada por Challenge Bioproductos Co., Ltd. (Taiwán). El resto de los reactivos se obtuvieron de las siguientes empresas: ácido acético, metanol, etanol (grado analítico) y NaOH (99 %) por Merck-México S.A, Naucalpan Estado de México; aceite de silicona por Fluka Chemie GmbH, Steinheim. En todos los experimentos se utilizó agua destilada.

### Obtención de la quitosana

En la preparación de esta muestra se partió de 138.8 g de una muestra de quitina de cabeza de camarón, la cual se colocó en un reactor de acero inoxidable con capacidad de 20 L, enchaquetado y alimentado con vapor por medio de un control automático, diseñado en el CIAD, A. C., y a continuación se agregó NaOH al 50% (p/p) a una temperatura de 100°C con agitación constante y burbujeo de nitrógeno por un tiempo de 2 h, hasta que el producto fue soluble en ácido acético 0.1 N. La quitosana obtenida se lavó hasta neutralidad; los dos

últimos lavados fueron con agua destilada y se procedió a secar a temperatura ambiente.

### Purificación de la quitosana

Se preparó una solución de 5 g/L de quitosana en ácido acético 0.5 M la cual se filtró consecutivamente a través de fritas de vidrio y membranas de 40, 16, 8, 3, 1.2 y 0.8  $\mu\text{m}$ . La solución fue neutralizada con NaOH al 10 % (pH 8.0), el precipitado obtenido de este proceso fue separado por centrifugación (10000 rpm, 15 min), lavado gradualmente con soluciones de etanol:agua (70:30, 80:20, 90:10 y 100:0) y secado a vacío a temperatura ambiente.

### Caracterización de la quitosana

#### *Grado de acetilación*

Valoración potenciométrica. La determinación potenciométrica del grado de N-acetilación de la quitosana se realizó por los métodos descritos por Broussignac [78] y Muzzarelli [79]. La quitosana se disolvió en un exceso conocido de HCl 0.01N. La solución de quitosana se valoró con una solución de NaOH 0.1N y se usó un pH-metro equipado con un electrodo de vidrio. Se obtuvo una curva de pH frente a volumen de NaOH añadido, curva que presentó dos puntos de inflexión. La diferencia de volumen entre estos dos puntos corresponde con el ácido consumido para la protonación de los grupos amino y permite la determinación del grado de acetilación de la quitosana.

Valoración conductimétrica. Se utilizó el método descrito por Raymond y colaboradores [80] el cual se basa en la elevada conductancia que presentan los



iones hidrógeno e hidroxilo en comparación con otros. Nuevamente, una solución de quitosana en exceso de HCl se valoró con una solución de NaOH y se usó, en este caso, un conductímetro. El punto de equivalencia se calculó determinando las posiciones de las intersecciones de las ramas correspondientes de la curva. La diferencia entre estos dos puntos de intersección corresponde al volumen de NaOH requerido para neutralizar los grupos amino libres de la quitosana, lo que nos permitió determinar el grado de N-acetilación de la muestra.

#### *Peso molecular promedio viscosimétrico (Mv)*

Se determinó por viscosimetría capilar en un viscosímetro tipo Ubbelohde, sumergido en un baño Koehler modelo K23400 (Bohemia, NY), iluminado y controlado a  $25 \pm 0.01^\circ\text{C}$  por un enfriador Neslab FTC-350 (Estados Unidos). Se utilizó una solución de quitosana en ácido acético 0.3M/acetato de sodio 0.2M. El peso molecular se obtuvo a partir de la ecuación de Mark-Houwink ( $[\eta] = KM_v^a$ ), usando los valores de las constantes de  $K = 0.074 \text{ mL/g}$  y  $a = 0.76$ , estimadas por Rinaudo y colaboradores [81].

#### Membranas de quitosana

Se prepararon membranas de 200 y 500  $\mu\text{m}$  de espesor a partir de disoluciones de Qs al 2% en ácido acético 0.1 M; dicha disolución se extendió sobre placas petri de vidrio, ésta fue secada a temperatura ambiente por un tiempo de 15 a 16 horas, neutralizada con varios lavados de NaOH al 4 % durante 15 minutos cada lavado, después se lavó con  $\text{H}_2\text{O}$  hasta obtener pH neutro y secada en un desecador a vacío.

### Síntesis del Copolímero de quitosana injertado con N-isopropil acrilamida

La preparación del copolímero de quitosana injertada con N-isopropilacrilamida (NIPA) se preparó de acuerdo al protocolo descrito por Kim y colaboradores [82] y modificado en nuestro laboratorio [83]. La polimerización del injerto de NIPA sobre la quitosana se realizó usando nitrato de amonio cérico (NAC) como iniciador bajo atmósfera de nitrógeno. La quitosana se disolvió al 1 % p/p de solución acuosa de ácido acético. El monómero NIPA y  $2 \times 10^{-3}$  M de NAC se agregaron a la solución de quitosana y la mezcla de la reacción fué mantenida a 25°C por 2 horas. Después de la polimerización del injerto, los productos se precipitaron en exceso de acetona y se separaron por filtración, para retirar el exceso de homopolímero con ayuda de una extracción con metanol durante 48 horas en soxhlet.

### Geles de quitosana y del copolímero

Los geles de quitosana y del copolímero entrecruzados químicamente con genipina, se prepararon a partir de soluciones de quitosana y/o copolímero a concentración de 1.5% (p/p) disuelto en ácido acético 0.1 M. A dichas soluciones se les agregó genipina, disuelta en metanol a una concentración de 0.1 g/mL. La solución fue vertida en moldes cilíndricos de PVC de  $\Phi=13$  mm y  $h=12$  mm previamente impregnados con aceite de silicona entre dos placas de vidrio para evitar su deshidratación. La reacción se dejó transcurrir durante 24 horas a 25 °C, salvo que se indique lo contrario.

## Acondicionamiento de los geles para su posterior tratamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico

Una vez elaborados, los hidrogeles se pasaron a una solución de 100:0 etanol:agua, incrementando gradualmente la concentración de etanol de acuerdo a las siguientes proporciones: 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 y 100:0, respectivamente. Estos alcogeles se utilizaron para elaborar las estructuras porosas por diferentes tratamientos de CO<sub>2</sub> supercrítico.

## Elaboración de estructuras porosas por Extracción Supercrítica

Las condiciones del proceso de extracción supercrítica se estudiaron a 40 °C y 100 bar de temperatura y presión, respectivamente, por tiempos variables de 30 min, 1, 2 y 3 horas. La despresurización del sistema fue entre 3400 y 4800 cm<sup>3</sup>/min. Estos estudios se llevaron a cabo en un equipo de extracción supercrítica Marc Sims Dense Gas Management System (Berkeley CA, USA).

## Caracterización fisicoquímica

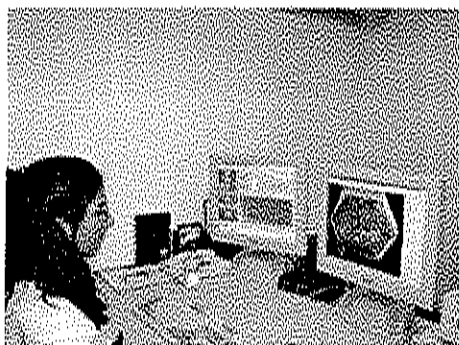
*Estudios de hinchamiento.* El hinchamiento ( $W$ ) de las membranas y de los andamiajes en agua, etanol, HCl 0.1M y NaOH 0.1M, a temperatura controlada se determinó mediante mediciones de incremento del peso.

$$W = \frac{P - P_0}{P_0} = \frac{P}{P_0} - 1 \quad (1)$$

Donde  $P_0$  es el peso de la membrana o del andamiaje seco y  $P$  es el peso de la membrana o del andamiaje hinchado.

*Determinaciones microcalorimétricas.* Las transiciones térmicas en los andamiajes se monitorearon por microcalorimetría diferencial de barrido (micro-DSC), en un equipo Setaram ( $\mu$ DSC-IIIa, Caluire, Francia) cargando una porción del andamiaje dentro de la celda del calorímetro y agregando una solución de buffer. El buffer se agregó también a la celda de referencia. Se realizaron barridos de temperatura en el intervalo de 5 a 70°C para los andamiajes de quitosana y entre 5 a 50°C para los andamiajes del copolímero Qs-g-NIPA.

*Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM).* Se llevó a cabo en un Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental FEI Quanta 200, para el estudio de los andamiajes durante el proceso de hinchamiento en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros del CSIC, en Madrid, España.



**Figura 6.** Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental FEI Quanta 200.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Obtención y purificación de la quitosana

Inicialmente se procedió a la obtención de la quitosana (Qs), para lo cual se partió de 138.8 g de quitina preparada en la planta piloto del Laboratorio de Biopolímeros en CIAD, A. C. Hermosillo, obteniendo así 99.2 g de Qs después del proceso. El rendimiento obtenido del 74.2%, el cual está dentro de lo reportado para esta reacción [85].

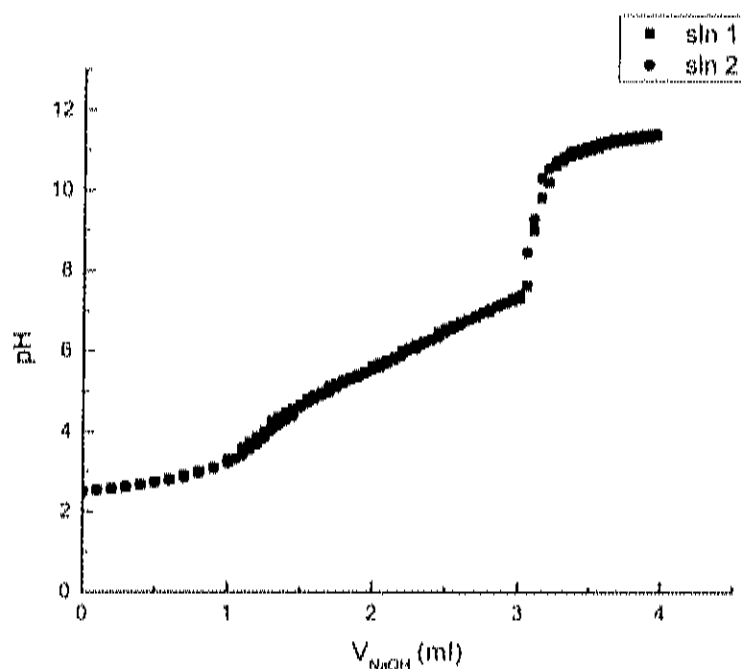
Una vez obtenida la Qs en planta piloto, se procedió a la purificación de la misma tal como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos. El objetivo de este procedimiento es la eliminación de partículas insolubles y la remoción de agregados, obteniéndose un polímero soluble y en condiciones apropiadas para su empleo en la preparación de andamiajes porosos.

### Caracterización de la quitosana

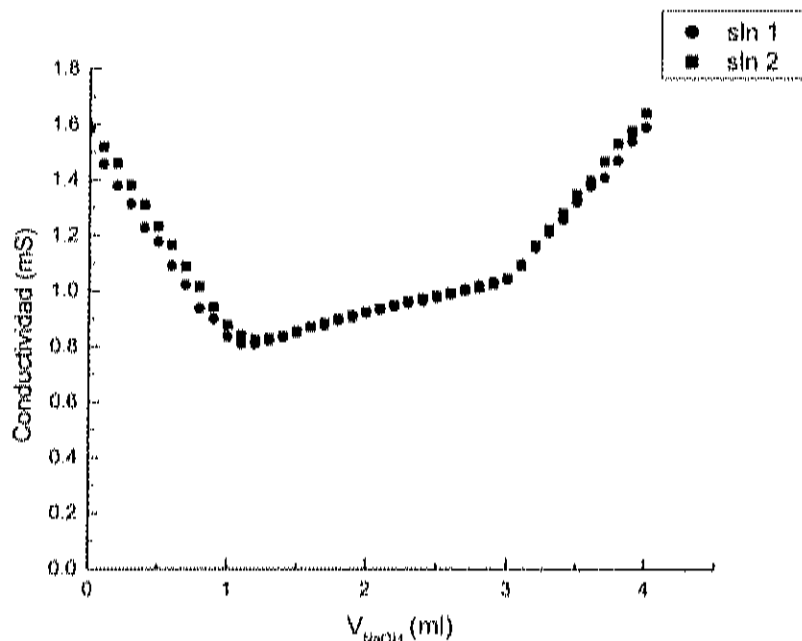
La caracterización de la Qs, se llevó a cabo por medio de valoraciones potenciométricas y conductimétricas , este análisis se llevo a cabo por duplicado (Fig.7-8). En la valoración conductimétrica la neutralización del exceso de ácido se manifestó como una disminución casi lineal de la conductividad de la solución hasta llegar a un valor mínimo (Fig. 8). A continuación se produjo un incremento

de la conductividad debido a la neutralización de los grupos amino protonados de la Qs. Esta curva presentó cierta curvatura motivada por la precipitación de la Qs, precipitación que comienza a  $\text{pH} \approx 6.5$ .

Cuando la neutralización se completó, la curva ascendente adquirió una mayor pendiente debido al exceso del álcali añadido, cuyos iones presentan una alta movilidad. Los cambios de pendiente que se observan en los dos puntos mencionados presentan cierta curvatura. Este hecho se debe, en el primer caso, a la disociación inicial de los grupos amino protonados de la Qs y, en el segundo caso, a la precipitación de la Qs antes mencionada. De esta forma, la equivalencia se calculó determinando las posiciones de las intersecciones de las ramas correspondientes de la curva. La diferencia entre los dos puntos de intersección corresponde al volumen de NaOH requerido para neutralizar los grupos amino libres de la Qs, lo que permite determinar el grado de N-acetilación de la muestra.



**Figura 7.** Curva de las valoraciones potenciométricas de las soluciones de Quitosana (soln 1 y soln2) con NaOH  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$



**Figura 8.** Curva de valoraciones conductimétricas de las soluciones de Quitosana (sln 1 y sln 2) con NaOH 0.1 mol·L<sup>-1</sup>

La determinación del peso molecular ( $M_v = 2.1 \times 10^5$  g/mol) se basa en la obtención de la viscosidad intrínseca  $[\eta]$ , que está relacionada con el peso molecular a través de la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada:

$$[\eta] = KM_v^a \quad (2)$$

En esta ecuación,  $M_v$  es el peso molecular promedio viscosimétrico y  $K$  y  $a$  son dos constantes que dependen de la naturaleza del polímero, del sistema disolvente utilizado y de la temperatura. En nuestro caso se utilizaron los valores de 0.074 mL/g y 0.76 para  $K$  y  $a$ , respectivamente, propuestas por Rinaudo y col. para un disolvente compuesto por CH<sub>3</sub>COOH 0.3 M / CH<sub>3</sub>COONa 0.2 M a una temperatura de 25°C, debido a que el grado de acetilación es cercano a 21 [81].

Para la medida de la viscosidad de la Qs se empleó un viscosímetro Ubbelohde. En este viscosímetro, se midió el tiempo que tarda en fluir por el capilar un volumen constante de disolución. Para un flujo newtoniano es posible relacionar la viscosidad mediante la ecuación de Poiseuille:

$$v = \frac{\pi P r^4}{8 \eta l} \quad (3)$$

En esta ecuación,  $v$  es la velocidad del flujo del volumen contenido entre las dos marcas,  $P$  es la diferencia de presión que mantiene el flujo,  $r$  es el radio del capilar,  $\eta$  es la viscosidad del líquido y  $l$  la longitud del capilar.

Replanteando la ecuación (3) en forma apropiada para el cálculo de la relación de viscosidad definida por:

$$\eta = \frac{\eta_{\text{solución}}}{\eta_{\text{solvente}}} = \frac{\eta_2}{\eta_1} \quad (4)$$

entendiéndose que ambos valores fueron tomados a la misma temperatura.

Para disoluciones diluidas las densidades de la solución y del solvente  $\rho_1$  y  $\rho_2$ , respectivamente, son prácticamente idénticas:

$$\eta_{\text{rel}} = \frac{\eta_2}{\eta_1} = \frac{t_2}{t_1}$$

La variación de la relación de viscosidad con la concentración de polímero disuelto puede expresarse como una serie de potencias de la concentración, de acuerdo a la ecuación de Huggins:

$$\frac{\eta_2}{\eta_1} = 1 + [\eta]c + kc^2 + \dots \quad (6)$$

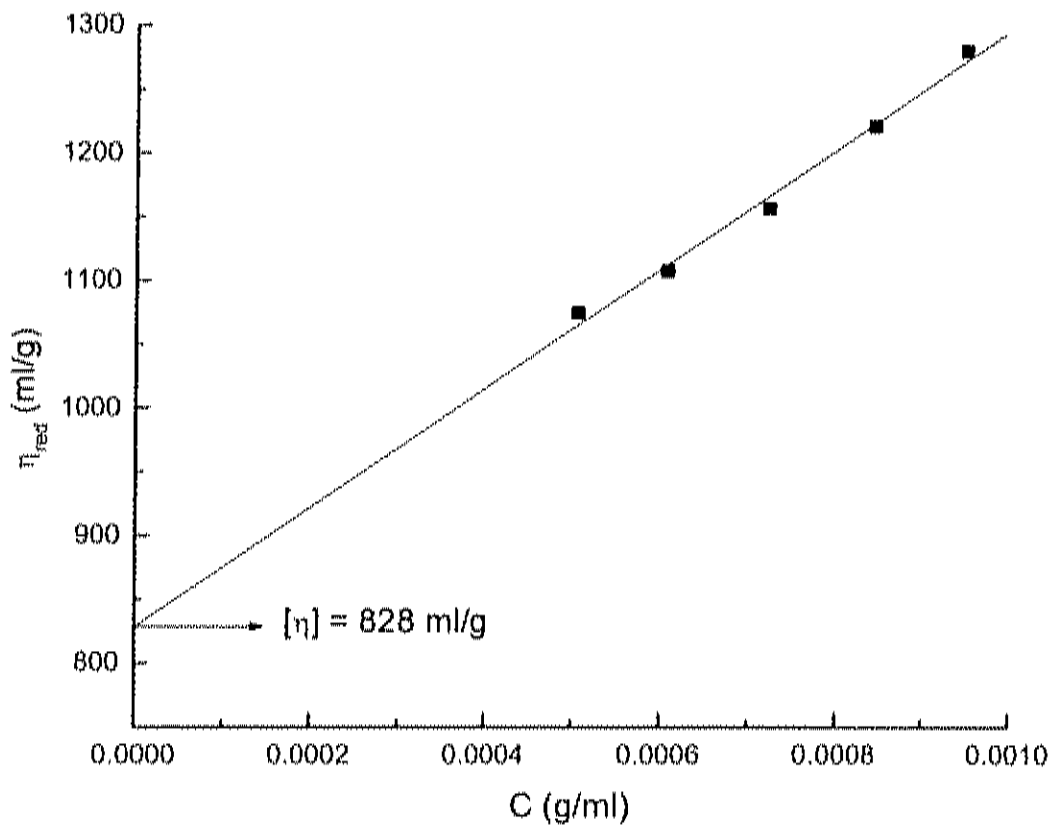
donde,  $[\eta]$  y  $k$  son constantes. Esta ecuación muestra simplemente que para concentración cero la relación de viscosidad es la unidad y que a mayores concentraciones esta cantidad aumenta de forma parabólica con el incremento de  $c$  (el cuarto término en la expresión no se hace importante hasta que se alcancen altos valores de  $c$ ).



Al ser una disolución diluida sólo se necesita considerar los tres primeros términos en la expresión anterior. La ecuación (6) puede reordenarse de la siguiente forma:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_2 - \eta_1}{\eta_1 c} = [\eta] + kc \quad (7)$$

Donde se representa en una gráfica el término de la viscosidad reducida ( $\eta_{red}$ ) frente a  $c$ , obteniendo así una línea recta de pendiente  $k$  y ordenada en el origen  $[\eta]$  (Fig. 9).



**Figura 9.** Gráfico de  $\eta_{red}$  frente a  $c$  para la muestra de Quitosana a 25°C disuelta en el sistema disolvente propuesto por Rinaudo y colaboradores [81]

En la Tabla 1 se resumen las características de la quitosana. Como se puede apreciar, presenta buenas características para el trabajo de obtención de andamiajes porosos.

**Tabla 1.** Características de la Quitosana obtenida en planta piloto de CIAD.

Humedad	4.9 ± 0.2 %
Cenizas	0.99 ± 0.04 %
Grado de Acetilación	0.20 ± 0.01
Peso Molec. promedio viscosimétrico	2.1 · 10 <sup>5</sup> g/mol

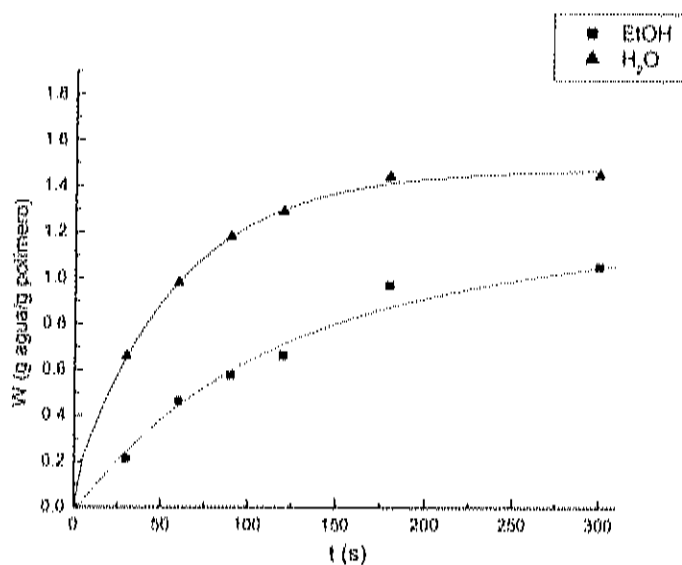
### Membranas de quitosana

Una de las vías para preparar andamiajes porosos es a partir de películas de los polímeros de partida. Por su parte, los estudios de hinchamiento permiten determinar la expansividad o aumento de volumen de las membranas. Por esta razón, realizamos un estudio comparativo del hinchamiento de películas de quitosana en agua y etanol a diferentes temperaturas (25 y 40°C). Las películas de Qs –con grosores de 200 y 500 μm– se formaron a partir de una solución al 2 % (p/p) en ácido acético diluido, mediante el método de *casting-out*, secado y neutralización. Las películas preparadas por este método resultaron homogéneas y reproducibles; al mismo tiempo eran transparentes y con buenas propiedades mecánicas.

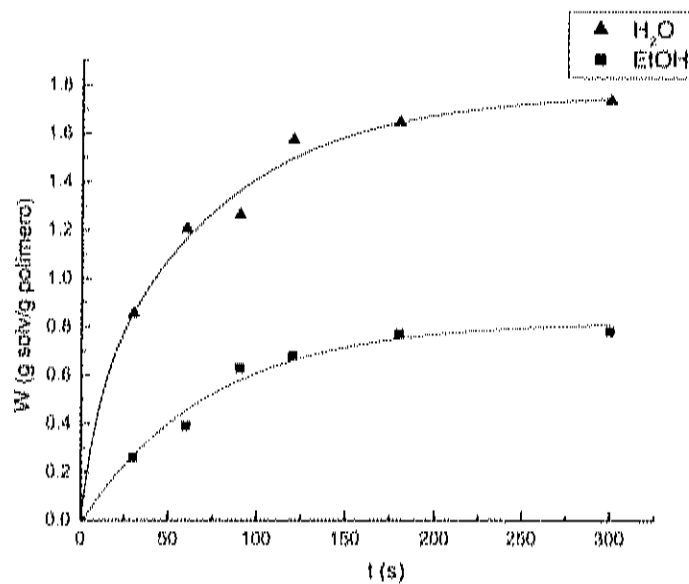
Durante el proceso de hinchamiento lo que ocurre es que cuando el material polimérico entra en contacto con un disolvente, éste último comienza a difundir hacia dentro del retículo polimérico debido al diferente potencial químico. Al hincharse el retículo producto de la absorción del solvente, las cadenas entre las uniones del retículo tienen que asumir configuraciones cada vez más elongadas, y consecuentemente se desarrolla una fuerza elástica retráctil en oposición al proceso de hinchamiento. Al transcurrir el hinchamiento, esta fuerza se incrementa y decrece la fuerza diluyente. En última instancia, se alcanza un estado de equilibrio en el cual esas dos fuerzas se encuentran balanceadas.

En las figuras 10 y 11 se muestra el proceso de hinchamiento de las membranas en H<sub>2</sub>O y etanol a 25 y 40°C respectivamente. En las mismas se puede apreciar

que las membranas se hinchan más en H<sub>2</sub>O que en etanol, lo cual es debido a que el agua es mejor solvente para la quitosana, favoreciendo más las interacciones de largo alcance. Resulta interesante destacar que a 40°C el hinchamiento de las películas de quitosana en agua se incrementa respecto a 25°C, mientras que con etanol este efecto es inverso.

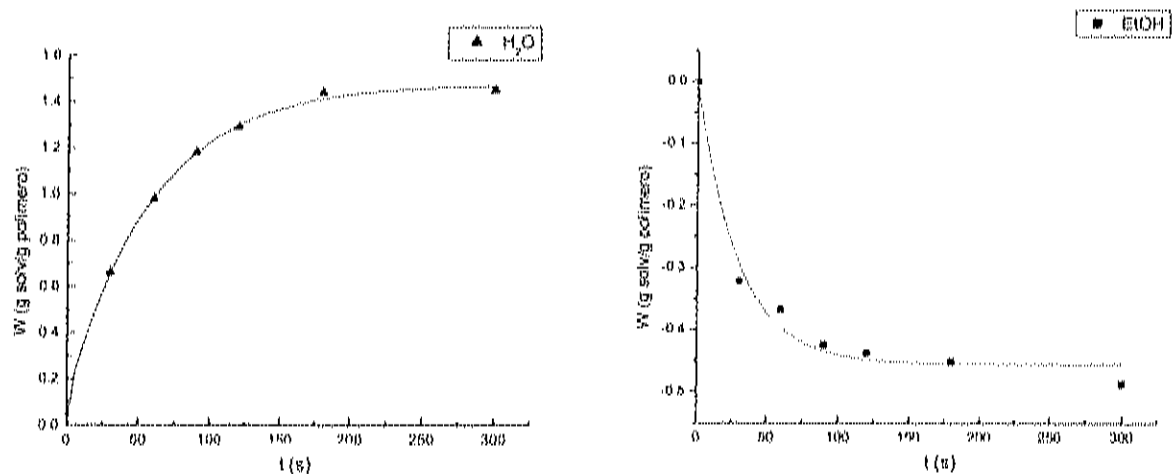


**Figura 10.** Proceso de hinchamiento de membranas de quitosana (500 μm) en H<sub>2</sub>O y en etanol a 25°C. Los puntos corresponden a los valores experimentales y los trazos al ajuste de los mismos a la ecuación (8).



**Figura 11.** Proceso de hinchamiento de membranas de quitosana (500  $\mu\text{m}$ ) en  $\text{H}_2\text{O}$  y en etanol a  $40^\circ\text{C}$ . Los puntos corresponden a los valores experimentales y los trazos al ajuste de los mismos a la ecuación (8).

A estas membranas, también se les realizaron estudios de hinchamiento a  $25^\circ\text{C}$  en agua, seguidos de hinchamiento en etanol (Fig. 12). Es posible apreciar que al momento de empezar a cambiar la membrana hinchada en agua a etanol, lo que realmente ocurre es una contracción, lo cual concuerda con el criterio de que el hinchamiento directo en etanol es menor debido a que el etanol es peor solvente que el agua para la quitosana.

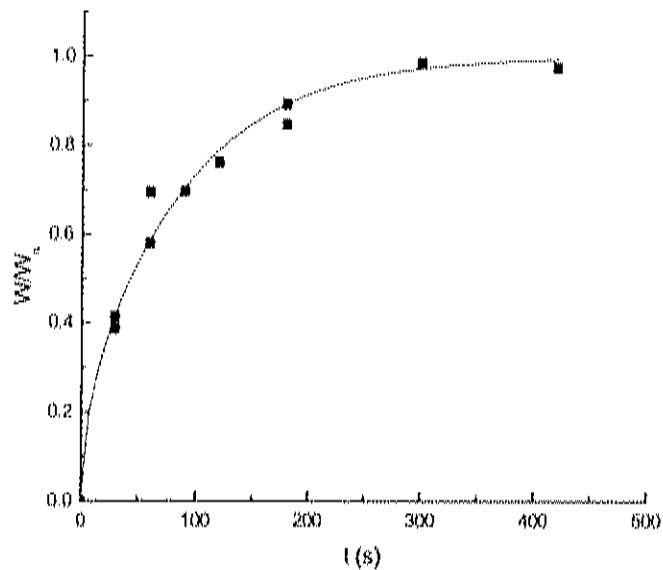


**Figura 12.** Proceso de hinchamiento de membranas de quitosana (500  $\mu\text{m}$ ) a 25°C en H<sub>2</sub>O y cambiadas a etanol.

Los datos de hinchamiento logrados de las membranas de Qs (Fig. 10, 11 y 12) fueron ajustados a la solución de las ecuaciones diferenciales de Fick, asumiendo una geometría plana (membrana) como se muestra en la ecuación (8) [86].

$$\frac{W_t}{W_\infty} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2} \exp\left\{ \frac{-D(2n+1)^2 \pi^2 t}{4l^2} \right\} \quad (8)$$

la cual permite describir el proceso de transporte de masa durante la difusión, y analizar cuantitativamente sus características. Con este objetivo, los datos experimentales se someten a un ajuste por mínimos cuadrados no-lineales, a partir del cual es posible estimar el coeficiente de difusión ( $D$ ), el cual expresa cuantitativamente la velocidad a la que ocurre el proceso de difusión. A modo de ejemplo, en la Figura 13 se muestra el resultado de este proceso matemático para el hinchamiento de una película de quitosana en H<sub>2</sub>O a 25°C.



**Figura 13.** Ajuste de los datos experimentales del hinchamiento de una película de quitosana en agua a 25°C a la ecuación (8) por mínimos cuadrados no-lineales.

La Tabla 2 resume los valores del hinchamiento máximo en el equilibrio ( $W_{\infty}$ ) y  $D$ , obtenidos mediante la ecuación (8) para las membranas de Qs durante el proceso de hinchamiento en agua y etanol a 25 y 40°C, así como el proceso de contracción en etanol a ambas temperaturas. Del análisis de los valores calculados se puede apreciar que a pesar de que el valor del hinchamiento en el equilibrio para el etanol disminuye con la temperatura, el coeficiente de difusión de este proceso aumenta unas cinco veces. Debe también notarse que independientemente de la temperatura, el valor de la contracción es el mismo al sumergir en etanol la membrana hinchada en agua, aunque nuevamente en este caso el valor del coeficiente de difusión es mayor a 40°C.

**Tabla 2.** Resultados de las pruebas de hinchamiento de las membranas de quitosana a diferentes temperaturas.

Disolvente	25°C		40°C	
	$W_{\infty}$ g solv./g polím.	$D \times 10^{-10}$ ( $m^2 \cdot s^{-1}$ )	$W_{\infty}$ g solv./g polím.	$D \times 10^{-10}$ ( $m^2 \cdot s^{-1}$ )
Agua	1.45	3.45	1.70	6.12
Etanol	1.05	0.619	0.79	3.01
Contracción	-0.49	7.79	-0.48	10.5

Es significativo resaltar que el proceso de contracción conduce a un valor de equilibrio de hinchamiento de apenas 0.25 y 0.24 g etanol/g polímero seco a 25 y 40°C, respectivamente, los cuales son mucho menores que cuando la membrana se hincha directamente en etanol.

#### Geles de Quitosana/Genipina

En vista de los resultados anteriores se decidió intentar la obtención de andamiajes porosos de quitosana, mediante la preparación de hidrogeles químicos, su conversión en alcogeles para secar los mismos mediante extracción supercrítica. Con este objetivo se produjeron hidrogeles de quitosana a partir de soluciones al 1.5% en ácido acético diluido y entrecruzados con Gnp de acuerdo a los estudios anteriores llevado a cabo por nuestro grupo [87]. La cantidad de entrecruzante empleada correspondió a una relación en peso de 0.05 g de Gnp por g de Qs ( $R = 0.05^*$ ).

En la elaboración de los geles de Qs se observó que al inicio de la reacción la mezcla de Qs/Gnp se mostraba incolora, conforme transcurría el tiempo, fue tomando una coloración amarilla, amarilla-verdosa y finalmente azul. El tiempo de formación de los geles a 25°C fue de aproximadamente 24 h. Se ha reportado que

\* Para los fines de este trabajo, se considerará en todo momento  $R$  como la relación en peso de entrecruzante (Gnp) por gramo quitosana. Lo anterior, a fin de poder obtener y comparar geles con igual densidad de entrecruzamiento, tanto de Qs como de Qs-g-NIPA.

el color azul en los geles se debe a la reacción de la genipina con el oxígeno del aire, incluso se menciona la observación de una coloración más oscura en las zonas más externas del gel y una disminución gradual del color hacia las zonas internas [45, 84].

#### Geles del Copolímero Injertado de quitosana con N-isopropil acrilamida

Al mismo tiempo que se prepararon los hidrogeles de quitosana, se siguió el mismo procedimiento para la obtención de hidrogeles del copolímero de Quitosana-g-NIPA (N-isopropilacrilamida), con el fin de obtener también andamiajes porosos con respuesta ante cambios de temperatura. Para ese propósito, se utilizó una muestra de copolímero sintetizada en nuestro Laboratorio, y cuyas características se detallan en la Parte Experimental.

Los hidrogeles del copolímero Qs-g-NIPA se prepararon con dos diferentes grados de entrecruzamiento, los primeros con  $R = 0.5$  y los segundos con el mismo grado de entrecruzamiento que los de Qs/Gnp ( $R = 0.05$ ). Al inicio de la reacción de los geles con  $R = 0.5$  no se mostró ningún cambio aparente, sin embargo al transcurrir el tiempo sí se obtuvo una coloración amarilla, la cual duró por varias horas, hasta obtener la coloración azul, como en los de Qs/Gnp, esta reacción se llevo a cabo durante 24 h a temperatura ambiente. En los geles con  $R = 0.05$  la reacción ocurrió de la misma manera, sólo que la reacción de entrecruzamiento procedió de manera más lenta, probablemente por la menor disponibilidad de grupos amino libres comparado con quitosana, de acuerdo con este argumento, la mezcla de reactante se mantuvo durante una semana.

Otra de las observaciones que se hicieron en los geles formados con el copolímero, es que al aumentar el grado de entrecruzamiento los geles se volvían más firmes y presentaban un color azul más intenso. Además, se encontró que los geles con  $R = 0.5$ , adquirirían una coloración azul muy oscura (casi negra), lo que sugiere que a medida que aumenta el grado de entrecruzamiento ocurre una



extensiva agregación de las cadenas de Qs-g-NIPA y/o de las especies poliméricas de la Gnp, con la consecuente sinéresis observada.

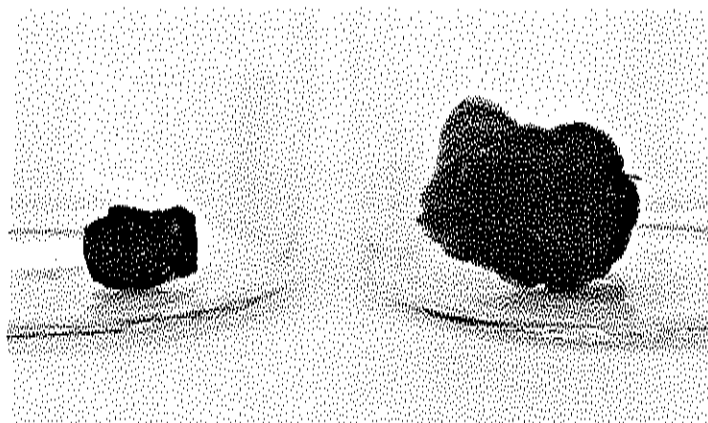
#### Elaboración de estructuras porosas con CO<sub>2</sub> supercrítico

Una vez elaborados los hidrogeles y convertidos en alcogeles como fue descrito en el capítulo anterior, se llevaron a cabo diferentes tratamientos con CO<sub>2</sub>sc, los cuales fueron a 40°C, 100 bar y de 3400 cm<sup>3</sup>/min – 4800 cm<sup>3</sup>/min, temperatura, presión y flujo respectivamente, a diferentes tiempos de extracción (Tabla 3) y dándole a las primeras dos corridas un tiempo de difusión previo (o hinchamiento) en CO<sub>2</sub>sc. Sin embargo, las experiencias preliminares demostraron que esta etapa era innecesaria y que sólo es importante el tiempo de extracción, ya que este procedimiento se basa en la extracción del etanol.

En las pruebas preliminares se obtuvo que a 30 min, 1 y 2 h, en los materiales quedaban residuos de disolvente, por lo cual al sacarlos del extractor se compactaban inmediatamente debido a que el etanol se volatilizaba. En contraste, se observó que para el tratamiento que se llevó a cabo durante 3 h ya no se obtenían residuos de disolvente, por lo tanto ya no se contraía el andamiaje y obteníamos así el material deseado (Fig. 14).

**Tabla 3.** Tiempos de extracción supercrítica a los que fueron expuestos los diferentes alcogeles de Quitosana.

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo</b>
1	30 min difusión/30 min extracción
2	30 min difusión/1 h extracción
3	2 h extracción
4	3 h extracción

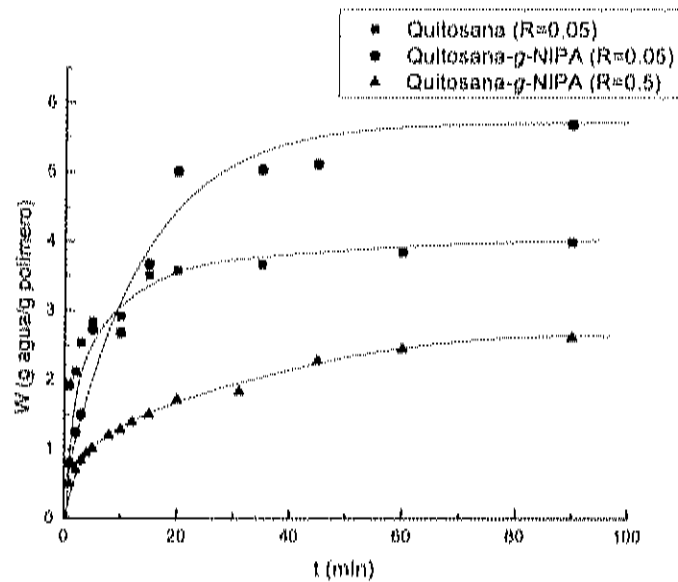


**Figura 14.** Andamiajes obtenidos después del proceso de ESC, a la izquierda andamiaje de Quitosana ( $R=0.05$ ) y a la derecha del copolímero Quitosana-g-NIPA ( $R=0.5$ ).

### Caracterización fisicoquímica de los Andamiajes

#### *Estudios de hinchamiento*

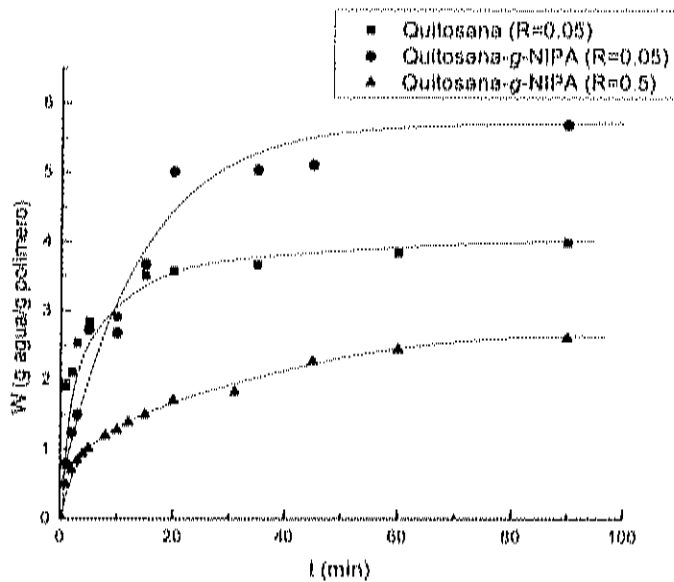
Después de obtener los andamiajes, se llevaron a cabo los estudios de hinchamiento. El objetivo principal de este estudio es obtener información acerca del entrecruzamiento y porosidad de estos materiales y determinar la influencia de la temperatura y pH del medio sobre el proceso de hinchamiento y el comportamiento de los mismos. En la Figura 15 se muestran las curvas de hinchamiento de los tres tipos de andamiajes de Qs y Qs-g-NIPA ( $R = 0.5$  y  $0.05$ ) en agua a  $25^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 15.** Hinchamiento de andamiajes porosos de quitosana y quitosana-g-NIPA ( $R = 0.5$  y  $0.05$ ) en agua a  $25^{\circ}\text{C}$ .

De la Figura 15 se puede apreciar que al comparar el hinchamiento de los andamiajes de Qs y Qs-g-NIPA con igual nivel de entrecruzamiento ( $R = 0.05$ ), el andamiaje del copolímero se hincha más que el de Qs. Por otra parte, al hacer una comparación del hinchamiento de los andamiajes de Qs-g-NIPA, se observa que el grado de hinchamiento es mayor en los andamiajes con  $R = 0.05$  con respecto al de mayor densidad de entrecruzamiento. Esta diferencia es lógica, debido a que al disminuir la concentración del entrecruzante hace que la distancia entre entrecruzamientos sea mayor y que el tamaño de poros de la red aumente, incrementándose así la capacidad de absorción de agua.

Para el caso de los andamiajes de quitosana, se estudió la dependencia del hinchamiento en agua en función de la temperatura ( $10, 25, 35, 45, 60$  y  $75^{\circ}\text{C}$ ). Para ello, los resultados del hinchamiento a cada temperatura se resolvieron matemáticamente considerando el caso de difusión para una geometría esférica donde  $r$  es el radio de la esfera y  $D$  es el coeficiente de difusión. En este caso, la solución al sistema de ecuaciones diferenciales de Fick es [86]:



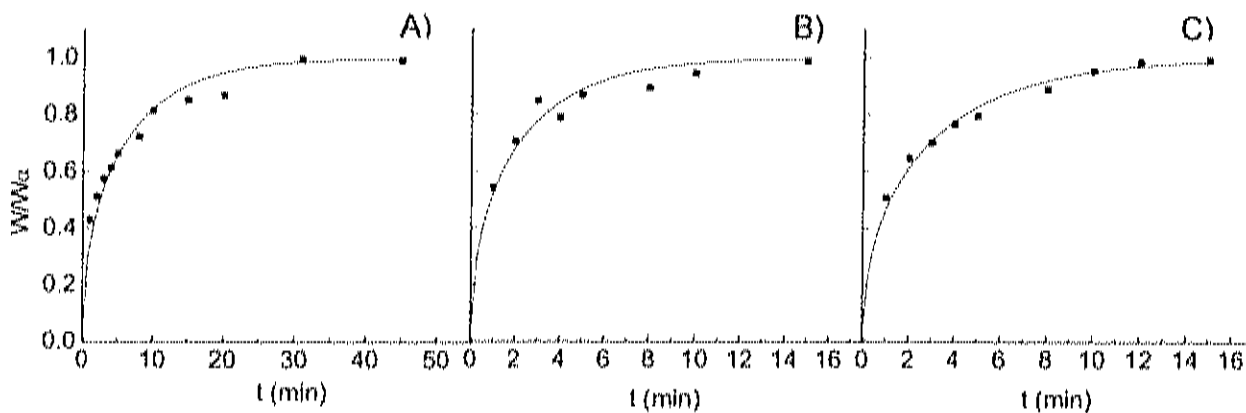
**Figura 15.** Hinchamiento de andamiajes porosos de quitosana y quitosana-g-NIPA ( $R = 0.5$  y  $0.05$ ) en agua a  $25^{\circ}\text{C}$ .

De la Figura 15 se puede apreciar que al comparar el hinchamiento de los andamiajes de Qs y Qs-g-NIPA con igual nivel de entrecruzamiento ( $R = 0.05$ ), el andamiaje del copolímero se hincha más que el de Qs. Por otra parte, al hacer una comparación del hinchamiento de los andamiajes de Qs-g-NIPA, se observa que el grado de hinchamiento es mayor en los andamiajes con  $R = 0.05$  con respecto al de mayor densidad de entrecruzamiento. Esta diferencia es lógica, debido a que al disminuir la concentración del entrecruzante hace que la distancia entre entrecruzamientos sea mayor y que el tamaño de poros de la red aumente, incrementándose así la capacidad de absorción de agua.

Para el caso de los andamiajes de quitosana, se estudió la dependencia del hinchamiento en agua en función de la temperatura ( $10, 25, 35, 45, 60$  y  $75^{\circ}\text{C}$ ). Para ello, los resultados del hinchamiento a cada temperatura se resolvieron matemáticamente considerando el caso de difusión para una geometría esférica donde  $r$  es el radio de la esfera y  $D$  es el coeficiente de difusión. En este caso, la solución al sistema de ecuaciones diferenciales de Fick es [86]:

$$\frac{W_t}{W_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(\frac{-Dn^2\pi^2t}{r^2}\right) \quad (9)$$

La ecuación (9) puede ser resuelta para los primeros 16 términos de la sumatoria y arreglada a los datos experimentales por mínimos cuadrados no-lineales siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. En todos los casos los datos concordaron satisfactoriamente a la ecuación de difusión, como se muestra en la Figura 16 en tres de esas curvas (10, 35 y 75°C) trazadas usando la ecuación de Fick.



**Figura 16.** Ajuste a la ecuación (9) de los datos experimentales del hinchamiento en agua de los andamiajes de quitosana, a diferentes temperaturas: A-10; B-35 y C-70 °C.

De los datos y ajustes obtenidos de los estudios de hinchamiento en agua a diferentes temperaturas de los andamiajes de Qs se calculó  $D$ . Los valores de  $W_{\max}$  y  $D$  obtenidos se resumen en la Tabla 4. Llama la atención que ninguno de los dos parámetros sigue una tendencia única en función de la temperatura, en particular, el coeficiente de difusión inicialmente se incrementa con la temperatura, hasta llegar a un valor máximo a 35°C, apreciándose posteriormente un decremento en el valor de este parámetro. Este comportamiento es diferente del que se ha reportado para el hinchamiento en agua de membranas del complejo polielectrolito Quitosana-alginato [88].

**Tabla 4.** Hinchamiento máximo ( $W_{max}$ ) y coeficiente de difusión ( $D$ ) para andamiajes de Quitosana durante el hinchamiento en agua a diferentes temperaturas.

T	$W_{max}$	$D \times 10^{-8}$
°C	g H <sub>2</sub> O/g polim.	m <sup>2</sup> · s <sup>-1</sup>
10	3.06	0.81
25	3.6	1.51
35	2.8	2.64
45	2.95	2.07
60	2.09	1.49
75	2.38	1.35

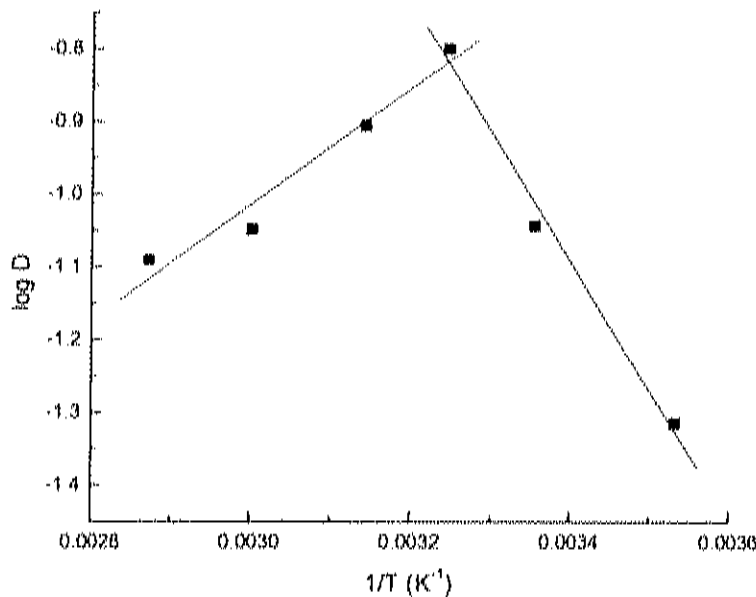
Es posible realizar un análisis más detallado de este fenómeno si se asume que el coeficiente de difusión posee una dependencia con la temperatura tipo-Arrhenius de acuerdo con la ecuación:

$$D = A \exp\left(-\frac{Ea}{RT}\right) \quad (10)$$

lo cual ha sido verificado por varios autores [88, 90] y que permite estimar la energía de activación aparente del proceso de hinchamiento. Esta metodología permite estimar la energía gastada en contra de las fuerzas cohesivas del polímero al formar los poros y canales por donde ocurre la difusión.

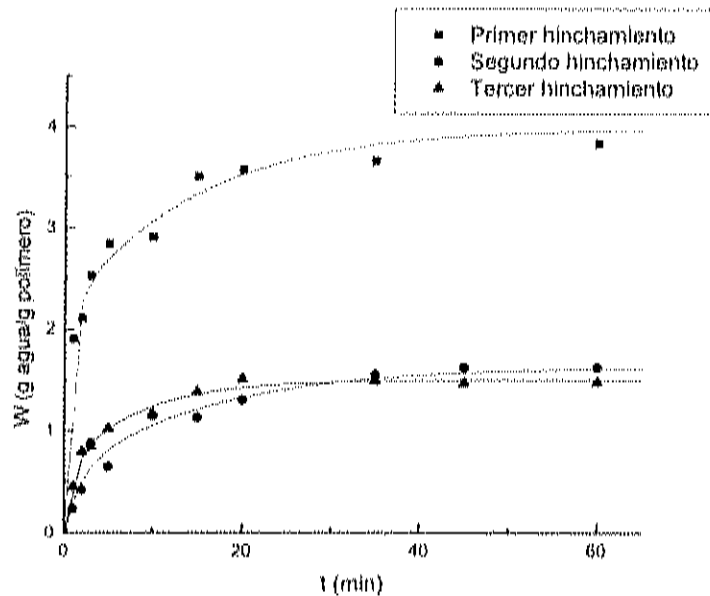
Para obtener la energía de activación aparente del hinchamiento, se llevó a cabo un gráfico de Arrhenius con los coeficientes de difusión, tal y como se muestra en la Figura 17. Es evidente la presencia de dos procesos con valores de energía de activación diferentes (-6.6 y 14.7 kJ/mol a altas y bajas temperaturas, respectivamente), pasando de un proceso endotérmico a uno exotérmico a partir de 35°C. Este cambio en el valor de la energía de activación aparente a partir de 35°C indica la aparición de un nuevo proceso, que se contrapone a la difusión y como resultante de ese contrabalance, el coeficiente de difusión se hace cada vez menor con el aumento de la temperatura.

Hasta donde conocemos, no existe un reporte similar sobre este fenómeno. Al presente no es posible dar una explicación acertada sobre la naturaleza de este proceso que se opone a la difusión, pero no se debe descartar que con el incremento de la temperatura se favorezcan interacciones de naturaleza hidrofóbica en la matriz polimérica del andamiaje, lo cual conduzca a una disminución en la relajación de la tensión de las cadenas poliméricas. Llama la atención que existen reportes similares acerca de cambios en la energía de activación de otros procesos químicos y físicos en materiales a base de quitosana [85, 90].



**Figura 17.** Ploteo de Arrhenius de la dependencia del coeficiente de difusión con la temperatura para andamiajes de quitosana en agua.

Con el propósito de evaluar las consecuencias de los procesos de relajación de las cadenas poliméricas durante un primer hinchamiento de los andamiajes de Qs se hicieron pruebas de hinchamientos sucesivos en agua a 25°C (Fig. 18).



**Figura 18.** Curvas de hinchamiento sucesivo de un mismo andamiaje de quitosana en agua a 25°C.

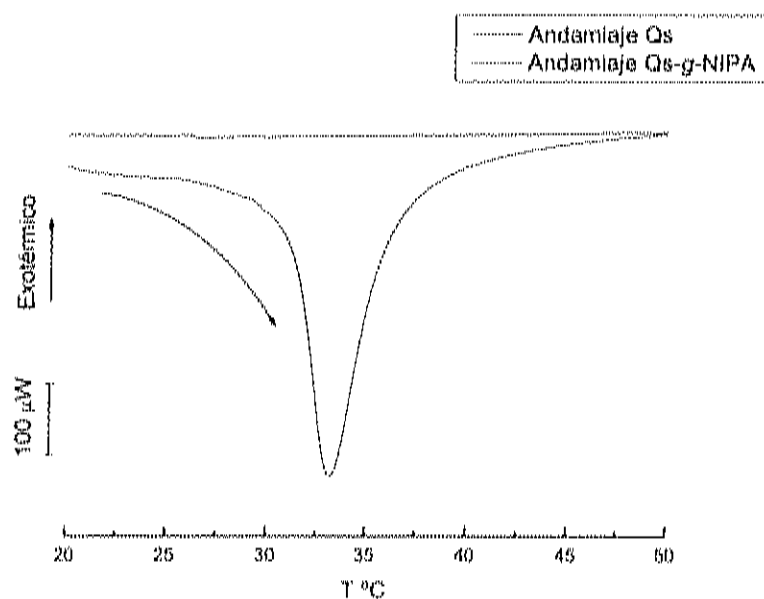
De los resultados de los experimentos realizados es indudable que durante el primer ciclo de hinchamiento-secado del andamiaje de quitosana ocurre un reacomodo del retículo polimérico, con la probable aparición de nuevas interacciones complementarias entre las cadenas del polímero, todo lo cual conduce a una pérdida en la capacidad de absorción de agua del andamiaje durante un segundo y tercer ciclos.

#### *Estudios de termosensibilidad*

Con el objetivo de valorar posibles transiciones de fase ante cambios de temperatura se realizaron determinaciones microcalorimétricas de los andamiajes de Qs y del copolímero después de un hinchamiento previo en agua a 25°C. En la Figura 19 se observan los trazos térmicos obtenidos durante el calentamiento controlado para los andamiajes de ambos materiales. Es evidente que los andamiajes de Qs no presentan ninguna transición térmica, mientras que en el copolímero hay un efecto endotérmico a temperatura cerca de los 32°C. Este hallazgo era lógico de esperar de acuerdo con las características que tienen las



cadenas de N-isopropilacrilamida de ser termosensibles, y resultados de investigación en curso que tienen lugar en nuestro Laboratorio.



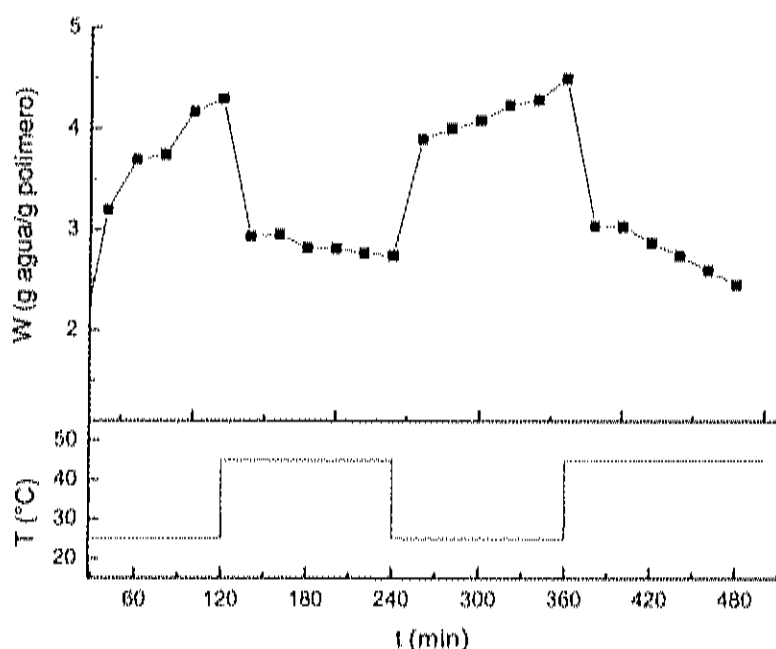
Muestra	T (°C)	$\Delta H$ (J/g)
Qs	-	0
Qs-g-NIPA	31.96	4.94

**Figura 19.** Curvas micro-DSC de andamiajes de quitosana ( $R=0.05$ ) y quitosana-*g*-NIPA ( $R=0.5$ ) hinchados previamente en agua a 25°C, durante un calentamiento controlado (0.6°C/min). El valor de entalpía está expresado por gramo de andamiaje hinchado a 25°C.

Complementariamente al estudio calorimétrico se llevaron a cabo pruebas de reversibilidad en el hinchamiento en agua de los andamiajes del copolímero con  $R=0.05$ , ante cambios de temperatura entre 25 y 45°C (Fig. 20). Del examen de esta figura se observa que al momento de calentar el andamiaje se contrae, y al volverlo a enfriar regresa a su estado de máximo hinchamiento. Es obvio que la transición térmica observada por microcalorimetría (Fig. 19) está relacionada con una contracción en el volumen del material hinchado. Debe notarse la rapidez con

que tiene lugar esta transición de fase en el hinchamiento de este tipo de andamiaje.

Al realizar dos ciclos de calentamiento-enfriamiento se comprobó que los andamiajes son sensibles a la temperatura y que se trata de una transición totalmente reversible. Esto demuestra que los andamiajes del copolímero Qs-g-NIPA son termosensibles, lo cual puede resultar de utilidad para el diseño de andamiajes poliméricos inteligentes.

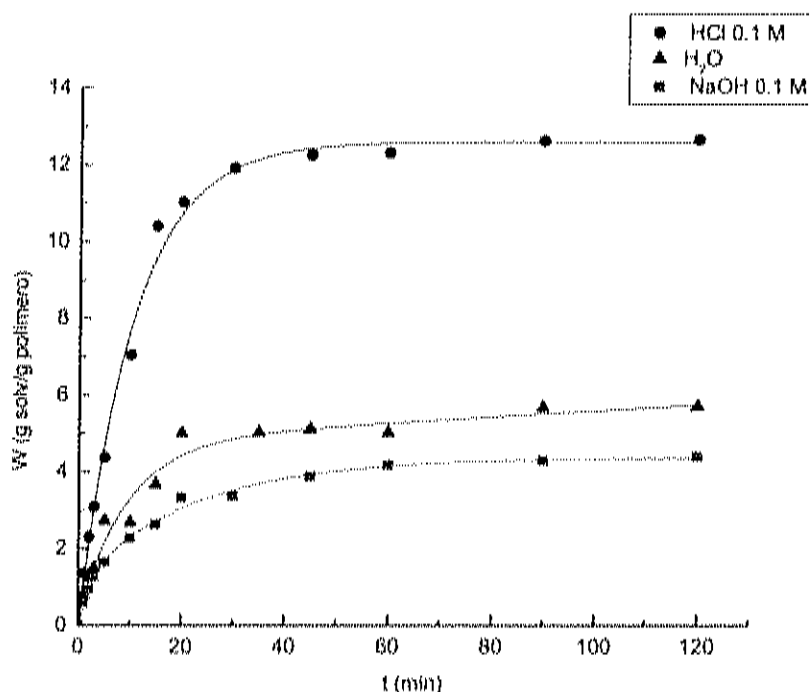


**Figura 20.** Reversibilidad en el hinchamiento en agua de andamiajes del copolímero quitosana-g-NIPA ( $R = 0.05$ ) ante cambios de temperatura entre 25 y 45°C, en ciclos de 120 minutos cada uno.

#### *Estudios de hinchamiento a diferentes pH*

Una vez concluidos los ensayos de hinchamiento en agua, se procedió a realizar pruebas de hinchamiento en medios con diferentes pH: HCl 0.1 M, NaOH 0.1M y agua (Fig. 21). En estas curvas se puede apreciar que en su proceso de hinchamiento los andamiajes del copolímero presentaron sensibilidad al pH del

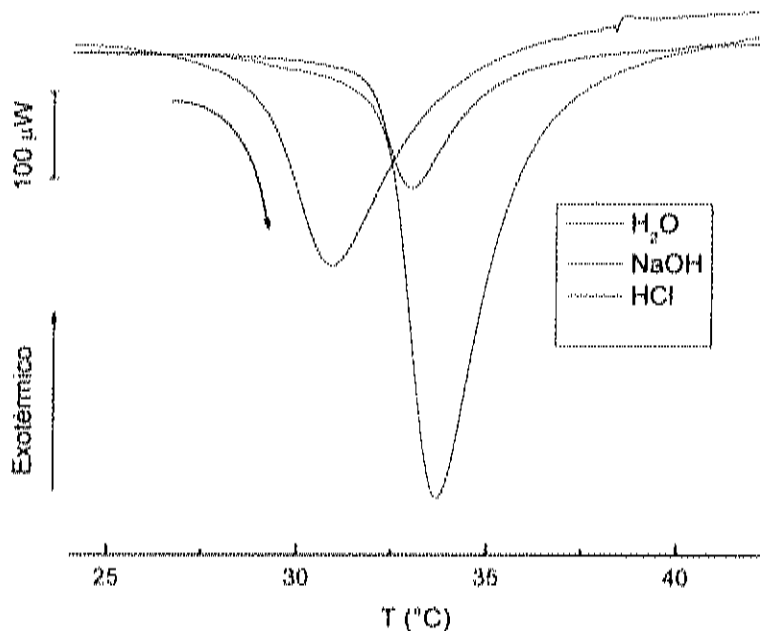
medio. Los andamiajes alcanzaron un mayor grado de hinchamiento a valores de pH ácido y mínimo en medio básico. Esta respuesta al pH está determinada por el compromiso entre la máxima repulsión que experimentan los grupos amino libres protonados de la cadena polimérica y el mínimo apantallamiento entre los mismos que genera la adición de un exceso de ácido. Mientras tanto, en medio básico, los grupos amino libres se encuentran sin carga, minimizando las repulsiones electrostáticas y por ende de las interacciones de largo alcance polímero-disolvente, lo cual conduce a una contracción del andamiaje y justifica el mínimo valor de hinchamiento observado en estas condiciones.



**Figura 21.** Curvas de hinchamiento a diferentes pH del copolímero quitosana-g-NIPA ( $R = 0.05$ ) a temperatura de 25°C.

Una vez hinchados en diferentes medios a 25°C, fue estudiado el comportamiento calorimétrico de los andamiajes de Qs-g-NIPA ( $R = 0.05$ ). En las curvas térmicas mostradas en la Figura 22, es manifiesto que con la neutralización de la cadena hay un desplazamiento de la transición de fases hacia temperaturas más bajas. Estudios de películas de este copolímero a diferentes pH realizadas en nuestro grupo de trabajo muestran la misma tendencia en la temperatura de transición de

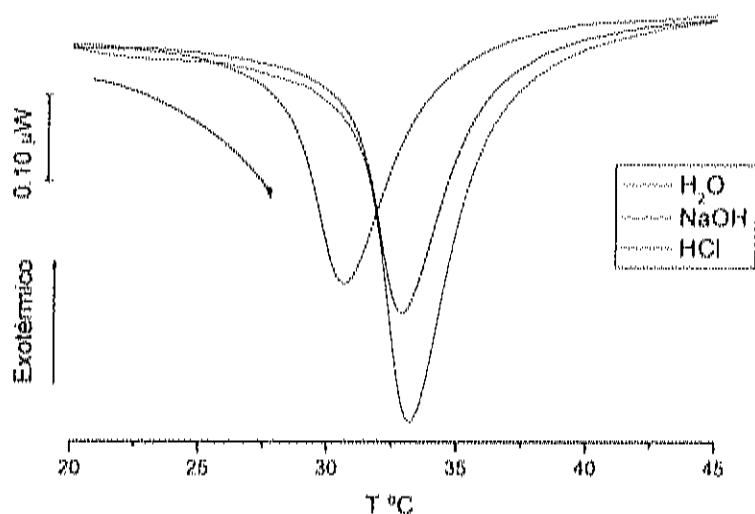
fase, lo cual ha sido interpretado como consecuencia de que al neutralizar la cadena polimérica se favorecen las interacciones hidrofóbicas en el polímero, las cuales serían las responsables de la disminución en la temperatura de transición.



Medio	T (°C)	$\Delta H$ (J/g)
H <sub>2</sub> O	33.67	3.72
NaOH	30.84	3.08
HCl	32.98	1.44

**Figura 22.** Curvas micro-DSC durante un calentamiento controlado (0.6°C/min) de andamiaje de Quitosana-g-NIPA (R = 0.05) hinchado directamente en agua, HCl 0.1 M y NaOH 0.1M a 25°C. El valor de entalpía está expresado por gramo de andamiaje hinchado a 25°C.

Una tendencia similar a la que se manifiesta cuando se hincha el andamiaje del copolímero en medios con diferentes pH, se observa al intercambiar un mismo andamiaje de Qs-g-NIPA (R = 0.5) hinchado previamente en agua entre los distintos medios (Fig. 23). Este resultado, pone en evidencia la reversibilidad de la respuesta de este material ante cambios en el pH.



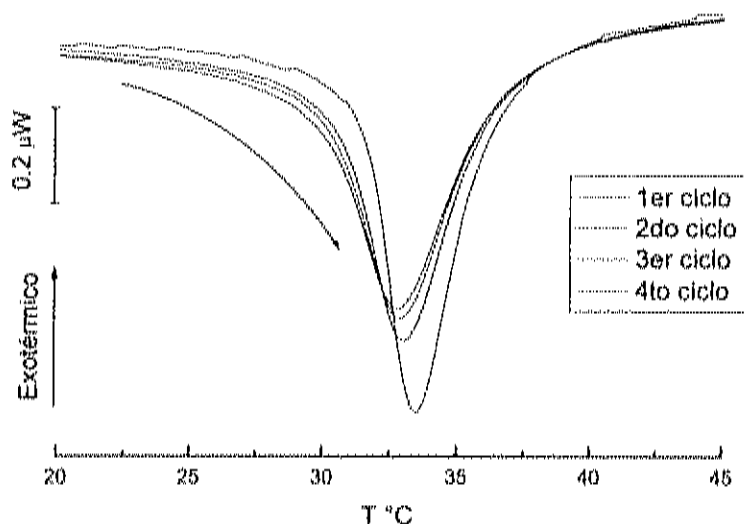
Medio	T (°C)	$\Delta H$ (J/g)
H <sub>2</sub> O	33.22	4.89
NaOH	28.29	4.02
HCl	32.45	3.76

**Figura 23.** Curvas micro-DSC durante un calentamiento controlado ( $0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) de andamiaje de Quitosana-*g*-NIPA ( $R = 0.5$ ) hinchado en agua a  $25^{\circ}\text{C}$  e intercambiado a NaOH 0.1M y HCl 0.1M, sin secar. El valor de entalpía está expresado por gramo de andamiaje hinchado a  $25^{\circ}\text{C}$ .

#### *Reversibilidad de la transición térmica*

Con el objetivo de verificar la reversibilidad de la transición de fases para los andamiajes de Qs-*g*-NIPA ( $R = 0.5$  y  $0.05$ ) hinchados en agua (Fig. 24 y 25, respectivamente) y del mismo material con  $R = 0.05$  hinchados en HCl 0.1M y NaOH 0.1M (Fig. 26 y 27, respectivamente), se hicieron ciclos sucesivos de calentamiento-enfriamiento en el microcalorímetro. En general, todos estos experimentos mostraron que la transición térmica en los andamiajes del

copolímero son prácticamente reversibles, sin que se aprecie ninguna diferencia significativa en cuanto a la temperatura de la transición, ni la entalpía asociada para los tres medios ensayados. El efecto fue también similar para los dos grados de entrecruzamiento del copolímero hinchado en agua.

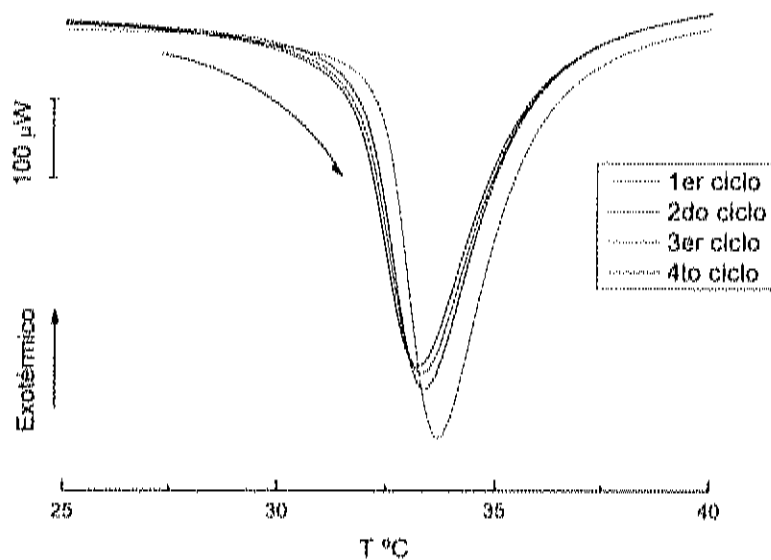


Ciclo	T (°C)	$\Delta H$ (J/g)
C1	33.5	4.39
C2	33.04	4.01
C3	32.9	3.83
C4	32.78	3.76

**Figura 24.** Curvas micro-DSC de andamiaje Quitosana-g-NIPA ( $R = 0.5$ ) previamente hinchado en  $H_2O$  a  $25^\circ C$ , durante 4 ciclos de calentamiento-enfriamiento. El valor de entalpía está expresado por gramo de andamiaje hinchado a  $25^\circ C$ .

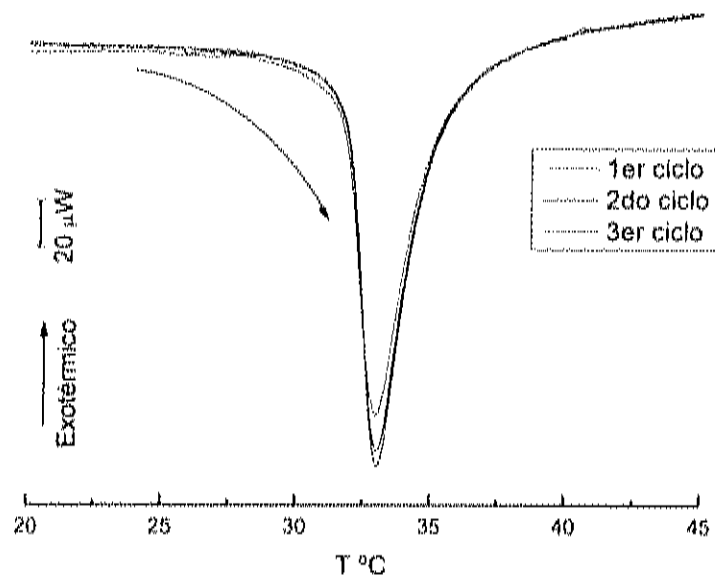
Un análisis de los valores de temperatura de transición y entalpía asociada durante el calentamiento controlado de los andamiajes con  $R = 0.5$  y  $0.05$  hinchados en agua (Fig. 24 y 25), muestra que hay una ligera tendencia a la disminución de ambos parámetros. Sin embargo, para el andamiaje del copolímero con  $R = 0.05$  hinchado en ácido y base (Fig. 26 y 27) esa tendencia solo se puede notar para la temperatura de transición, debido a que en estos dos

últimos casos el valor de la entalpía asociada a la transición térmica muestra una leve tendencia a incrementarse.



Ciclo	T (°C)	$\Delta H$ (J/g)
C1	33.67	3.72
C2	33.37	3.64
C3	33.31	3.63
C4	33.23	3.59

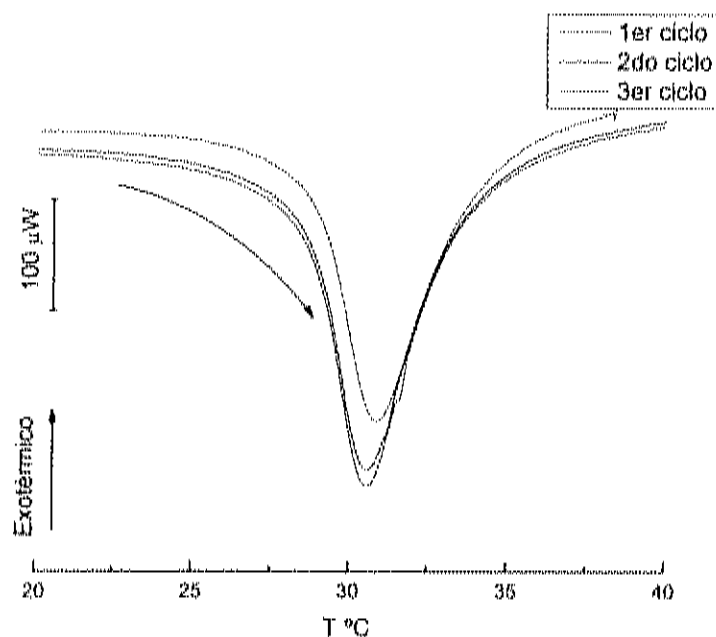
**Figura 25.** Curvas micro-DSC de andamiaje Quitosana-g-NIPA ( $R = 0.05$ ) previamente hinchado en  $H_2O$  a  $25^\circ C$ , durante 4 ciclos de calentamiento-enfriamiento. El valor de entalpía está expresado por gramo de andamiaje hinchado a  $25^\circ C$ .



Ciclo	T (°C)	$\Delta H$ (J/g)
C1	32.98	1.44
C2	33.06	1.48
C3	33.03	1.49

**Figura 26.** Curvas micro-DSC de andamiaje Quitosana-g-NIPA ( $R = 0.05$ ) previamente hinchado en HCl 0.1M a 25°C, durante 3 ciclos de calentamiento-enfriamiento. El valor de entalpía está expresado por gramo de andamiaje hinchado a 25°C.





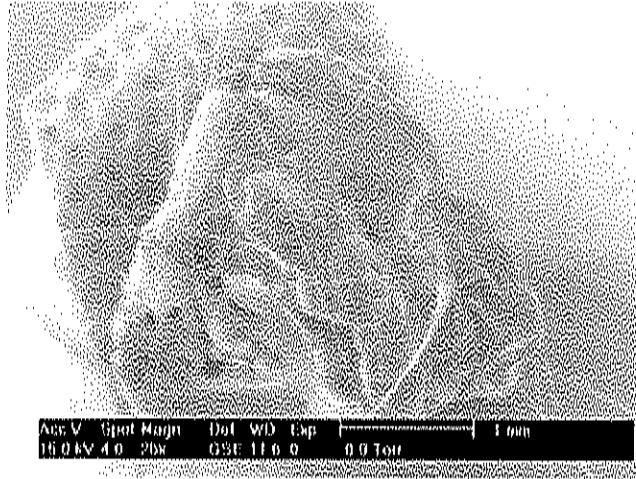
Ciclo	T (°C)	$\Delta H$ (J/g)
C1	30.84	3.08
C2	30.56	3.22
C3	30.64	3.32

**Figura 27.** Curvas micro-DSC de andamiaje Quitosana-g-NIPA ( $R = 0.05$ ) previamente hinchado en NaOH 0.1M a 25°C, durante 3 ciclos de calentamiento-enfriamiento. El valor de entalpía está expresado por gramo de andamiaje hinchado a 25°C.

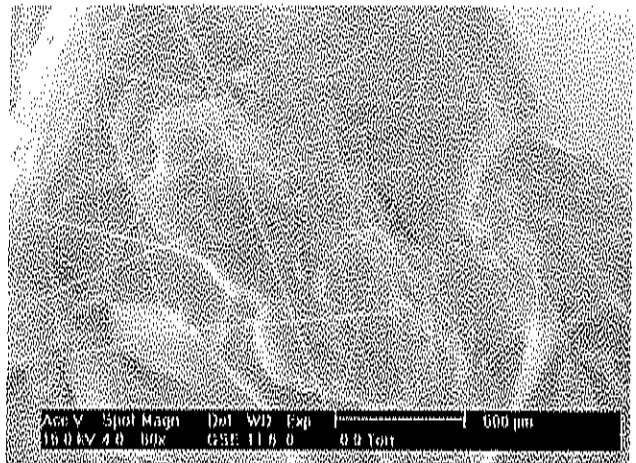
*Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM).*

La morfología de los andamiajes secos de Qs ( $R = 0.05$ ) y de Qs-g-NIPA ( $R = 0.5$ ) fueron estudiados por ESEM (Fig. 28 y 29). Debe aclararse que para el caso de los andamiajes de Qs aparece fibra de vidrio en la parte externa de los mismos (Fig. 28), lo cual se debe a que en el proceso de ESC se utilizó la fibra de vidrio como base de los andamiajes para que no fueran golpeados por las perlitas de vidrio que fueron colocadas en la parte inferior de la celda de extracción y por lo tanto no deben tenerse en cuenta en este análisis. El material tiene una microestructura fina de alta calidad con muy poca porosidad, además se observa

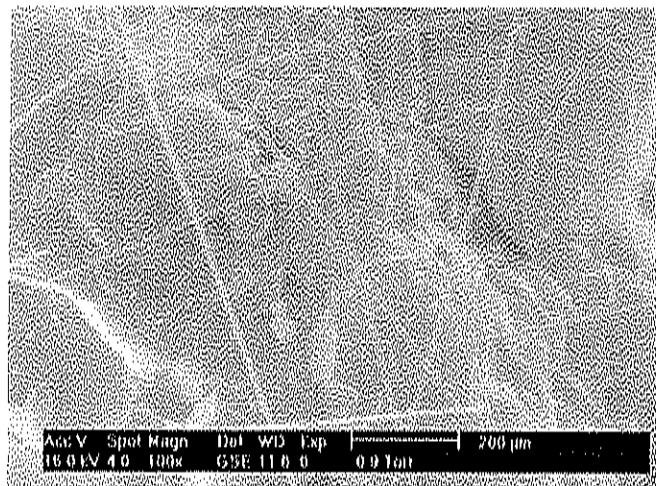
que el andamiaje de quitosana exhibe una cierta porosidad en su superficie exterior, misma que es especialmente visible en la Fig. 28a.



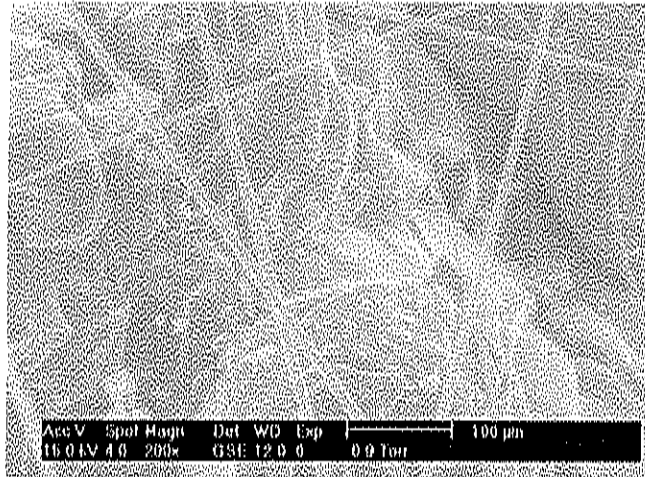
(a)



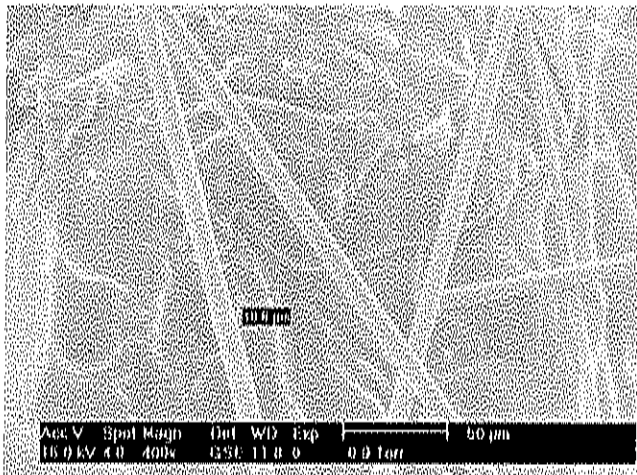
(b)



(c)



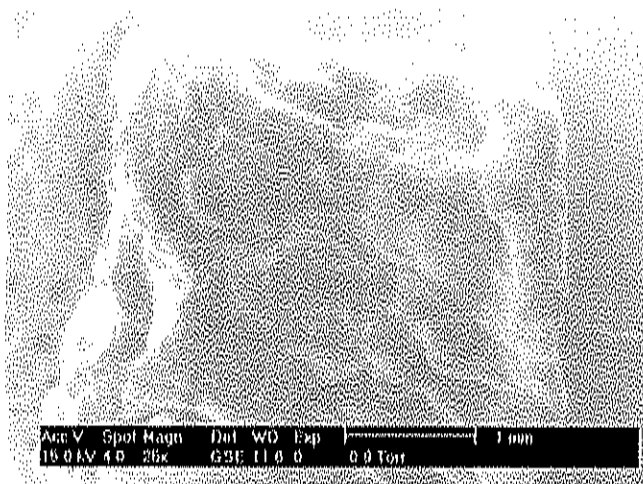
(d)



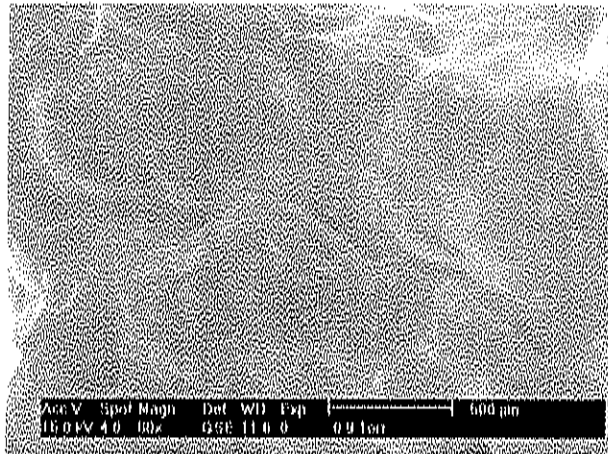
(e)

**Figura 28.** Fotografías obtenidas a partir de la ESEM de los andamiajes de quitosana ( $R = 0.05$ ) a resoluciones de (a) 1 mm; (b) 500  $\mu\text{m}$ ; (c) 200  $\mu\text{m}$ ; (d) 100  $\mu\text{m}$ ; (e) 50  $\mu\text{m}$ .

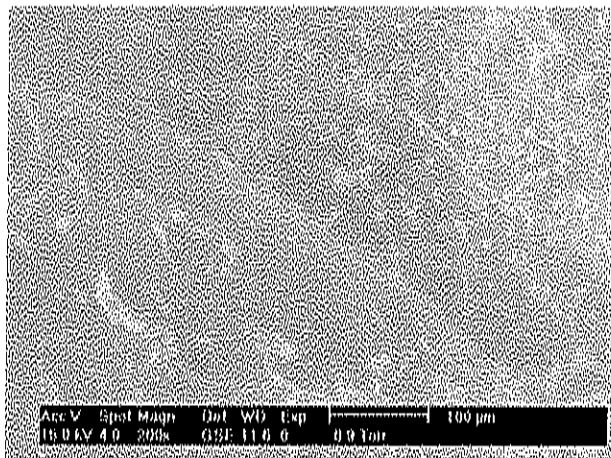
Una interpretación similar puede hacerse para el andamiaje de Qs-g-NIPA con  $R = 0.5$  (Fig. 29a), exhibiendo además una estructura ligeramente más densa que en el caso del andamiaje de Qs. Esta característica es lógico que se presente, debido a la mayor densidad de entrecruzamiento con que se preparó esta muestra.



(a)



(b)



(c)

**Figura 29.** Fotografías obtenidas a partir de la ESEM de los andamiajes de Quitosana-g-NIPA ( $R=0.5$ ) a resoluciones de (a) 1 mm; (b) 500  $\mu\text{m}$ ; (c) 100  $\mu\text{m}$ .

## CONCLUSIONES

Las membranas de quitosana presentaron mayor hinchamiento en agua que en etanol, lo cual está favorecido por las interacciones de largo alcance. Al momento de cambiar la membrana hinchada en agua a etanol ésta se contrae, debido a que el etanol es peor solvente para la quitosana.

Es posible obtener estructuras de andamiajes porosos de quitosana, con diferente grado de entrecruzamiento.

El proceso de hinchamiento de los andamiajes de quitosana mostró la existencia de dos energías de activación (14.7 y -6.6 kJ/mol a bajas y altas temperaturas, respectivamente), lo que indica que a temperaturas por encima de 35°C aparece un fenómeno diferente al proceso de difusión.

Los andamiajes del copolímero quitosana-g-NIPA mostraron sensibilidad al pH del medio y a la temperatura. Se observó que con la neutralización de la cadena ocurre un desplazamiento de la temperatura de transición hacia temperaturas más bajas. La transición de fases va acompañada de una contracción del andamiaje poroso y tiene un carácter reversible independientemente del pH del medio.

Tanto los andamiajes de quitosana, como los del copolímero, presentaron una microestructura con cierta porosidad en la superficie exterior. En el caso de los del copolímero se apreció una estructura ligeramente más densa en correspondencia con el mayor grado de entrecruzamiento.

## RECOMENDACIONES

Realizar un estudio más detallado sobre las energías de activación en el proceso de hinchamiento de los andamiajes de quitosana en agua.

Estudiar la morfología por ESEM de los andamiajes de quitosana y de quitosana-*g*-NIPA durante el proceso de hinchamiento.

Realizar investigaciones de difusión mediante RMN de campo bajo, ya que es una herramienta útil que puede brindar más información sobre los procesos de difusión en los andamiajes porosos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lee K. Y. and Mooney D. J. **2001**. Hydrogels for Tissue Engineering. *Chem. Reviews.* 101, p. 1869-1879.
2. Kazarian S. G. **2000**. Polymer processing with supercritical fluids. *Polymer Science.* 42:78-101.
3. Peniche C., Aguilar M.R., Aranaz I., Mayorga A., Paños I., San Román J, Tapia C. **2004**. Aplicaciones en ciencias de la vida. en: Ed. Ana Pastor de Abram. Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica de Perú p. p. 269-277
4. Rimmer S. **1994**. Biomaterials: Tissue Engineering and Polymers. En: *Emerging Themes in Polymer Science.* Ryan A.J. (ed.). The Royal Society of Chemistry. P. 89-99.
5. Putnam A. J.; Mooney D. J. **1996**. Tissue engineering using synthetic extracellular matrices. *Nat. Med.* 2: 824.
6. Vacanti J.P., Langer R., Upton J., Marler J. J. **1998**. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv.* 33, p. 165–182.
7. Langer R., Vacanti J. P. **1993**. Tissue engineering. *Science.* 260: 920
8. Rooney M. M., Farrell D. H., Van Hemel B. M., De Groot P. G., Lord S. T. **1998**. The contribution of the three hypothesized Integrin-binding sites in fibrinogen to platelet-mediated clot retraction. *Blood.* 92(7), p. 2374-81.
9. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. **1994**. Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. *Molecular Biology of the Cell*, 3rd Ed; Garland Publishing: New York and London, p 971-995.
10. Nakamatsu J., Rodríguez N. **2004**. Química de la quitina y el quitosano. En: Ed. Ana Pastor de Abram. Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica de Perú. p.p 75-102
11. Lárez-Velásquez, C. **2003**. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 4:2, 91-109

12. Horton D. y Lineback. **1965**. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Academic Press, Nueva York. P. 403.
13. Rigby G. W. **1936**. Chemical products and process of preparing the same. Estados Unidos de América, US Patent 2, 072, 771.
14. Goycoolea F., Agulló E., Mato R. Fuentes y procesos de obtención. En: Ed. Ana Pastor de Abram. *Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica de Perú. p.p. 126-127
15. Argüelles-Monal W., Goycoolea F. M., Lizardi J., Peniche C. and Higuera-Ciapara I. **2003**. Chitin and Chitosan in Gel Network Systems. *American Chemical Society*. 7, 102-120.
16. Brazel C. S., Pappas N. A. **1996**. Pulsatile local delivery of thrombolytic and antithrombotic agents using poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) hydrogels. *J Controlled Rel* 39, 57-64
17. Okano T., Bae Y. H., Jacobs H., Kim S. W. **1990**. Thermally on-off switching polymers for drug permeation and release. *J. Controlled Rel* 11, 225-265.
18. Peppas N. A., Khare A. R. **1993**. Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. *Adv. Drug Delivery Rec.* 11, 1-35
19. Hyon S. H., Cha W., Ikda Y., Kita M., Ogura Y. **1994**. Poly(vinyl alcohol) hydrogels as soft contact lens materials. *J. Biomater. Sci. Polym.* 5, 397-406.
20. Woerly S. **1993**. Hydrogels for neural tissue reconstruction and transplantation. *Biomaterials*. 14: 1056.
21. Vazquez B., Gurrunchaga M., Goni I., Narvarte E., Roman, J. S. **1995**. A pH-sensitive hydrogel based on poly(ethoxy triethylene glycol monomethacrylate). *Polymer*. 17: 3329.
22. Kataoka K., Koyo H., Tsuruta T. **1995**. Novel pH-Sensitive Hydrogels of Segmented Poly( amine ureas) Having a Repetitive Array of Polar and Apolar Units in the Main Chain. *Macromolecules*. 28, 3336-3341.



23. Bae Y. H., Okano T., Kim S. W. **1990**. Temperature dependence of swelling of crosslinked poly(N,N'-alkyl substituted acrylamides) in water. *J. Polymer Sci. Polym Phys.* 28: 923
24. Eisenberg S. R., Grodzinski A. J. **1984**. Electrically modulated membrane permeability. *J. Membr. Sci.* 19, 173-194.
25. Ricka J. Tanaka T. **1984**. Swelling of Ionic Gels: Quantitative Performance of the Donnan Theory. *Macromolecules.* 17, 2916
26. Berger J., Reist M., Mayer J.M., Felt O., Gurny R. **2004**. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmacy and Biopharmacy.* 57, 19-34
27. Berger J., Reist M., Mayer J.M., Felt O., Gurny R. **2004**. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmacy and Biopharmacy.* 57, 35-52
28. H. Van Esch J., Feringa B.L. Gels. **2004**. *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry.* 586-596
29. Watanabe J., Kiritoshi Y., Woo Nam K., Ishihara K. **2004**. Hydrogels. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering.* Ed. Marcel Dekker. 790-801
30. Alexeev V. L., Keberg E. A., Evmenenko, G. A. **2000**. Improvement of the mechanical properties of chitosan films by the addition of poly(ethylene oxide). *Polym. Eng. Sci.* 40, 1211.
31. Wang W., Roberts G. A. F., Domard A., Roberts G., Varum K. **1998**. *Proceedings of the 7th International Conference on Chitin & Chitosan and 2nd International Conference of the European Chitin Society.* *Adv. Chitin Sci.*, 2, 561.
32. Budtova T. A., Belnikevich N. I., Kalyuzhnaya L. J., Alexeev V. L. Bronnikov, S. E.; Vesnebolotskaya, S. V.; Zodshoev, Z. O. J. **2002**. Chitosan modified by poly(ethylene oxide): Film and mixture properties. *Appl. Polym. Sci.*, 84, 1114.

33. Long, F. L.; Tan, Y. C.; Liang, H. C.; Huang, R. N.; Sung, H. W. J. **2001**. In vitro evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipin. *Biomater. Sci., Polym.* 12, 835.
34. Zhang, Q.; Liu, L.; Ren, L.; Wang, F. **1997**. Preparation and characterization of collagen-chitosan composites. *J. Appl. Polym. Sci.*, 64, 2127.
35. Jiang W. H., Han S. J. **2000**. Study of interaction between polyethylene glycol and chitosan by viscosity method. *J Polym Sci. B36*, 1275
36. Goissis G., Junior E. M., Marcantonio R. A. C., Lia R. C. C., Cancian D. C. J., De Caevallho W. M. **1999**. Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking. *Biomaterials*. 20, 27.
37. Jonson K. A., Rogers G. J., Roe S. C., Howlett C. R., Claytone M. K., Millthorpe B. K., Schindhelm K. **1999**. Nitrous acid pretreatment of tendon xenografts cross-linked with glutaraldehyde and sterilized with gamma irradiation. *Biomaterials*. 20, 1003.
38. Nimni M. E., Cheung D., Kodama M., Sheikh K. *Collagen*. **1988**. CRC Press: Boca Raton, FL. p.p. 1
39. Noishiki Y., Kodaira K., Furuse M., Miyata T. **1989**. Method of pre-paring antithrombogenic medical materials. U.S. Patent No. 4,806,599.
40. Schmidt, C. E.; Baier, J. M. **2000**. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*. 21, 2215.
41. Speer D. P., Chvapil M., Eskelson C. D., Ulreich J. **1980**. Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* 14, 753.
42. Nishi, C.; Nakjima, N.; Ikada, Y. **1995**. In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification. *J. Biomed. Mater. Res.* 29, 829.
43. Touyama R., Takeda Y., Inoue K., Kawamura I., Yatsuzuka M., Ikumoto T., Shingu T., Yokoi T., Inouye H. **1994**. Studies on the Blue Pigments

- Produced from Genipin and Methylamine. I. Structures of the Brownish-Red Pigments, Intermediates Leading to the Blue Pigments. *Chem. Pharm. Bull.* 42, 668.
44. Huang L. L., Sung H. W., Tsai C. C., Huang D. M. **1998**. Biocompatibility study of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking reagent. *J. Biomed. Mater. Res*, 42, 568.
  45. Mi F. L., Sung H. W., Shyu S. S. **2000**. Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 38, 2804.
  46. Sung H. W., Huang L. L. H., Tsai C. C. **1999**. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 10, 63.
  47. Tsai T. H., Westly J., Lee T. F., Chen C. F. **1994**. Identification and determination of geniposide, genipin, gardenoside and geniposidic acid from herbs by HPLC/photodiode-array detection. *J. Liq. Chromatogr.* 17, 2199.
  48. Fujikawa S., Fukui Y., Koga K. **1987**. The continuous hydrolysis of geniposide to genipin using immobilized  $\beta$ -glucosidase on calcium alginate gel. *Biotechnol. Lett.*, 9, 697.
  49. Francis, S. J. K.; Matthew, H. W. T. **2000**. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*. 21, 2589.
  50. Ravi Kumar, N. V. M. **2000**. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym*, 46, 1.
  51. Sigh D. K., Ray A. R. **2000**. Biomedical applications of chitin, chitosan, and their derivatives. *Macromol. Chem. Phys.* 40, 69-83.
  52. Li Q., Dum E. T., Grandmaison E. W., Goodman M. F. A. **1992**. Applications and Properties of Chitosan. *J. Bioact. Compat. Polym.* 7, 370.
  53. Chandy T., Sharma C. P. **1990**. Chitosan as biomaterial. *Biomater. Art. Cells Art Org.* 18, 1.

54. Hudson S. M., Smith C. **1998**. Polysaccharide: chitin and chitosan: Chemistry and technology of their use as structural materials, In *Biopolymers from Renewable Resources*; Kaplan D. L., Ed. Springer: Berlin, p 96.
55. Roberts G. A. F. **1992**. *Chitin Chemistry*; MacMillan Press Ltd.: London.
56. Kas, H. S. **1997**. Chitosan: properties, preparation and application to microparticulate systems. *J Microencapsulation*. 14, 689.
57. Kubota, B.; Kikuchi, Y. **1998**. Macromolecular complexes of chitosan, In *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*; Dumitriu, S., Ed.; Marcel Dekker: New York. p 595
58. Lipatova T. E., Lipatov Y. S. **2000**. Biocompatible polymers for medical application. *Macromol. Symp*. 152, 139.
59. Seal B. L., Otero T. C., Panitch A. **2001**. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration *Mater. Sci. Eng., Reports* 34, 147.
60. Felt O., Buri P., Gurny R. **1998**. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 24, 979.
61. Di Martino A., Sittingerc M., Risbuda M. V. **2005**. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopedic tissue-engineering. *Biomaterials*. 26, 5983
62. Shia Z., Neoha K. G., Kanga E. T., Wang W. **2006**. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. *Biomaterials*. 27, 2440
63. Sundararajan V. Madihally y Howard W.T. Matthew. **1999**. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 20, 1133-1142
64. Zhao F., Yin Y., Lu W., Leong C., Zhang W., Zhang J., Zhang M., Yao K. **2002**. Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials* 23, 3227–3234.
65. Reverchon E. y Antonacci A. **2006**. Chitosan Microparticles Production by Supercritical Fluid Processing. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45, 5722-5728
66. Nakamatsu J., Torres F. G., Troncoso O. P., Min-Lin Y., y Boccaccini A. R. **2006**. Processing and Characterization of Porous Structures from Chitosan

- and Starch for Tissue Engineering Scaffolds. *Biomacromolecules*. 7, 3345-3355
67. Kazarian S. G., **2000**. Polymer Processing with Supercritical Fluids. *Polymer Science*, 42, 78-101.
68. Rizvi S. S. H., Benado A. L., Zollweg J. A., and Daniels J. A. **1986**. Supercritical Fluid Extraction: Fundamental Principles and Modeling Methods, *Food Technology* 40(6), 55-65.
69. Niessen H. G., Woelk K. **2005**. Investigations in Supercritical Fluids. *Top Curr. Chem.* 276, 69-110.
70. Kazarian S. G., Vincent M. F., Bright F. V., Liotta C. L., y Eckert C. A. **1996**. Specific Intermolecular Interaction of Carbon Dioxide with Polymers. *Journal of the American Chemical Society*. 118: 1729.
71. Kazarian S. G., Brantley N. H., West B. L., Vincent M. F., Eckert C. A. **1997**. In Situ Spectroscopy of Polymers Subjected to Supercritical CO<sub>2</sub>: Plasticization and Dye Impregnation. *Appl. Spectrosc.* 51, p. 491.
72. Howdle S. M., Watson M. S., Whitaker M. J., Popov V. K., Davies M. C., Mandel F. S., Wang J. D., Shakesheff K. M. **2001**. Supercritical fluid mixing: preparation of thermally sensitive polymer composites containing bioactive materials. *Chem. Comm.* 109-110.
73. Goel S. K., Beckman E. J., **1994**. Generation of microcellular polymeric foams using supercritical carbon dioxide. I: Effect of pressure and temperature on nucleation. *Polym. Eng. Sci.* 34, 1137-1147.
74. Mooney D. J., Baldwin D. F., Suth N. P., Vacanti L. P. and Langer R. **1996**. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactide-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials*. 17, 1417-1422.
75. Sheridan M. H., Shea L. D., Peters M. C. and Mooney D. J. **2000**. Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *J. Controlled Release*. 64, 91-102.
76. Le M., Dehghani F., Poole-Warren L., Foster N. **2005**. A novel method of fabrication of porous chitosan for biomedical or pharmaceutical applications. *Int. Symp. Supercrit. Fluids*, 188.pdf.

77. Briones, J. A.; Mullins, J. C.; Thies, M. C.; Kim, B. U. **1987**. Ternary phase equilibria for acetic acid-water mixtures with supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilib.* 36, 235-246.
78. Broussignac P. **1968**. Chitosan: a Natural Polymer not Well Known by the Industry, *Chimie & Industrie, Genie Chimique.* 99(9), 1241-1247
79. Muzzarelli R. A. A. **1977**. Chitin. Pergamon Press, Oxford.
80. Raymond L., Morin F. G., Marchessault R. H. **1993**. Degree of Deacetylation of Chitosan Using Conductimetric Titration and Solid-State NMR. *Carbohydr. Res.* 246, 331-336
81. Rinaudo M., Milas M., Le Dung P. **1993**. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International Journal of Biological Macromolecules.* 15, 281-285
82. Kim Y.; Cho M.; Lee M; Kim J. **2000**. Thermo- and pH-Responsive Behaviors of Graft Copolymer and Blend Based on Chitosan and N-Isopropylacrylamide. *Journal of Applied Polymer Science.* 78: 1381-1391.
83. Recillas M. **2007**. Guaymas, Sonora. Comunicación Personal.
84. Butler M. F., Yui-Fai N., Pudney P. D. A. **2003**. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science,* 41, 3941-3953.
85. Díaz, Erika. Tesis de Doctorado, **2005** "Aislamiento, Caracterización y Reactividad de Quitina".
86. Cranck J. *The Mathematics of Diffusion.* 2<sup>nd</sup> Edition, Oxford University Press, London **1975**, 414 pp.
87. Espinoza, Bibiana. Tesis de Maestría, **2006** "Geles impresos molecularmente con reconocimiento selectivo hacia análogos de bifenilo policlorados (BPC)"
88. Cárdenas A., Argüelles-Monal W., Goycoolea F., Higuera-Ciajara I., Peniche C. **2003**. Diffusion through membranes of the polyelectrolyte complex of chitosan and alginate. *Macromol. Biosci.* 3, 535-539.

89. Butler M.F., Yui-Fai N., Pudney P. D.A. **2003**. Mechanism and Kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science*. 41, 3941-3953.
90. Peniche C., Argüelles W., Román J. S. **1995**. Sorption and desorption of water vapour by membranes of the polyelectrolyte complex of chitosan and carboxymethyl cellulose. *Polymer International*. 38 (1), 45-52.

89. Butler M.F., Yui-Fai N., Pudney P. D.A. **2003**. Mechanism and Kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science*. 41, 3941-3953.
90. Peniche C., Argüelles W., Román J. S. **1995**. Sorption and desorption of water vapour by membranes of the polyelectrolyte complex of chitosan and carboxymethyl cellulose. *Polymer International*. 38 (1), 45-52.