

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ  
ESCUELA DE POSGRADO



**Síntesis de hidrogeles con derivado de quitosana y  
caracterización de sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN  
QUÍMICA**

**AUTOR**

Karen Nonaquina Gonzales Rojas

**ASESOR**

Dr. Javier Nakamatsu Kuniyoshi

2019

## RESUMEN

El objetivo principal del presente estudio fue la síntesis de hidrogeles de poliacrilamida e hidrogeles de poli(acrilamida-co-ácido acrílico) ambos con entrecruzamiento con N, N'- bismetilenacrilamida (MBAm) y derivado de quitosana (DCHI). Este último fue obtenido a partir del uso de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida como agente de acoplamiento para enlazar el ácido acrílico a la quitosana.

Los hidrogeles fueron estudiados mediante técnicas de caracterización de microscopía electrónica de barrido (SEM), calorimetría diferencial de barrido (DSC), ensayos mecánicos de compresión, de reología oscilatoria, así como la velocidad de hinchamiento o absorción de agua. Además, se evaluó las diferencias entre el agente de entrecruzamiento MBAm y el derivado de quitosana en una matriz de poliacrilamida, y sus efectos sobre las propiedades finales de los hidrogeles.

Las micrografías SEM obtenidas de los cortes transversales de los hidrogeles liofilizados permitieron observar las estructuras internas con poros interconectados, la forma y tamaño que tienen dichos poros, y su dependencia en función del tipo de formulación. La influencia del tipo de microestructura de cada hidrogel se vio reflejada en su capacidad de hinchamiento en agua. La capacidad de hinchamiento mínima fue de 2300 % y la más alta fue de 6800 % de agua absorbida.

Los hidrogeles sometidos a ensayos de compresión, permitieron obtener curvas de esfuerzo – deformación, de donde se determinó los valores del módulo elástico, siendo el valor mínimo alcanzado de 0,068 MPa y el máximo de 0,23 MPa. Los ensayos de reología se pudo determinar el rango de viscoelasticidad lineal, el módulo elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ), teniendo como comportamiento elástico predominante para todos los hidrogeles ( $G' > G''$ ). Además, de los ensayos oscilatorios en función de la frecuencia, se determinó la densidad de entrecruzamiento teórico usando la teoría de elasticidad del caucho.

Finalmente, se pudo concluir que, al aumentar la densidad de entrecruzamiento, las propiedades mecánicas y reológicas de los hidrogeles también aumentan. Sin embargo, la capacidad de hinchamiento en agua disminuye. Además, los hidrogeles derivados de quitosana tuvieron mejores propiedades en comparación a los hidrogeles basados en poliacrilamida.

## ABSTRACT

The main objective of this thesis was to synthesize crosslinked polyacrylamide hydrogels and poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels, both with N,N'-methylene-bisacrylamide (MBAm) and chitosan derivative (DCHI). This DCHI was prepared by using N-(3-(dimethylamino)propyl)-N'-ethylcarbodiimide as a coupling agent in order to graft acrylic acid into the structure of chitosan.

The synthesized hydrogels were characterized using different techniques including scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC), compression mechanical analysis, oscillatory rheology, as well as the degree of swelling in water. Moreover, the effect on the final properties of the hydrogels due to the crosslinking agent, MBAm and DCHI, and the interactions were evaluated.

SEM micrographs obtained from the cross sections of the lyophilized hydrogels depicted the internal structures with interconnected micropores for all samples. Pore's shape and size depend on the specific formulation for each hydrogel. In addition, the variability in the microstructure of the synthesized hydrogels had an effect on the swelling properties. The minimum value was 2300 % and the maximum was 6800%.

The mechanical behaviour of hydrogels depicted elastic modulus between 0,068 and 0,23 MPa. Rheological studies showed hydrogels form stable viscoelastic solid gels and display a predominant elastic behaviour ( $G' > G''$ ). Also, it was possible to determine the linear viscoelastic regions for all hydrogels from stress sweep tests. Frequency sweep tests showed that the storage modulus  $G'$  had a constant value for each type of hydrogel. The theoretical crosslink density was calculated using the rubber elasticity theory and the storage modulus from the frequency sweep tests.

Finally, with the increase of crosslinking density in the structure, there was an improvement of the mechanical and rheological properties of the hydrogels. However, the swelling properties decrease. Furthermore, chitosan derived hydrogels had better properties compared to polyacrylamide-based hydrogels.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT), que a través del convenio 231-2015 FONDECYT, me fue otorgada una beca de posgrado para continuar mis estudios de Maestría en Química en la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP).

Agradezco a mi asesor, Dr. Javier Nakamatsu, por su apoyo constante, dedicación y guía durante el desarrollo de la presente tesis. Además, a los integrantes del Laboratorio 211, por su compañerismo y soporte brindado. A Jimmy Cánepa por brindarme la quitosana que fue utilizada en la tesis.

Al Dr. Fernando Torres, jefe del grupo de Polímeros y Materiales Compuestos (POLYCOM) de la PUCP, por su apoyo y permitirme usar los equipos para la caracterización mecánica y térmica de los hidrogeles sintetizados.

Al director del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICTP – CSIC) de Madrid, Dr. Daniel López, y la Dra. Coro Echeverría por su apoyo en la caracterización de los hidrogeles mediante microscopía electrónica de barrido y reología. Al convenio de Movilización en Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica 2018 – 03 FONDECYT, que me permitió realizar la estancia en el ICTP para completar la caracterización de los hidrogeles con las técnicas mencionadas.

A los profesores de la Maestría en Química de la PUCP les agradezco, por brindarme sus conocimientos y compartir sus experiencias académicas.

Finalmente, de manera muy especial, agradezco todo el apoyo brindando por mi Padre y mis amigos más allegados, por motivarme a seguir avanzando.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	2
ABSTRACT .....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
TABLA DE CONTENIDO .....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ABREVIATURAS .....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	13
3. OBJETIVOS .....	13
3.1 Objetivo general:.....	13
3.2 Objetivos específicos:.....	13
4. MARCO TEÓRICO .....	14
4.1 Hidrogeles .....	14
4.1.1 Síntesis de hidrogeles.....	16
4.1.2 Propiedades de los hidrogeles .....	17
4.1.2.1 Expansión de su volumen e hinchamiento hasta el equilibrio .....	17
4.1.2.2 Propiedades mecánicas .....	18
4.1.2.3 Reología de hidrogeles:.....	19
4.1.5 Aplicaciones en Ingeniería de tejidos .....	23
4.2 Quitosana .....	25
4.2.1 Obtención de la quitosana .....	25
4.2.2 Composición y estructura química .....	26
4.2.3 Derivados de quitosana .....	27
4.2.4 Propiedades y usos .....	28
4.2.5 Hidrogeles basados en quitosana .....	28
4.3 Acrilamida.....	30
4.3.1 Poliácridamida .....	30
4.4 Ácido acrílico.....	34
4.5 Agentes de acoplamiento .....	35

5.	HIPÓTESIS .....	39
6.	METODOLOGÍA .....	39
6.1	Reactivos .....	39
6.2	Materiales y Equipos.....	40
6.3	Procedimiento .....	40
6.3.1	Síntesis de hidrogeles de poliacrilamida .....	40
6.3.2	Síntesis de derivados de quitosana.....	41
6.3.3	Síntesis de hidrogeles con derivados de quitosana y poliacrilamida .....	41
6.4	Caracterización .....	43
6.4.1	Espectroscopia FT-IR .....	43
6.4.2	Análisis morfológico .....	43
6.4.3	Grado de hinchamiento o absorción de agua.....	43
6.4.4	Análisis térmico.....	44
6.4.5	Caracterización mecánica.....	44
6.4.6	Caracterización reológica.....	44
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	45
7.1	Formación de los hidrogeles.....	45
7.2	Características físicas de los hidrogeles secos.....	46
7.3	Mecanismo propuesto de síntesis de hidrogeles con derivados de quitosana y poliacrilamida.....	47
7.4	Caracterización por IR.....	48
7.5	Análisis morfológico.....	51
7.6	Grado de hinchamiento o absorción de agua ( <i>HH<sub>2</sub>O absorbido</i> ).....	57
7.7	Análisis térmico .....	61
7.8	Caracterización mecánica .....	65
7.9	Caracterización reológica .....	69
8.	CONCLUSIONES .....	82
9.	RECOMENDACIONES.....	84
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	85
11.	ANEXOS.....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la estructura de un hidrogel.....	14
Figura 2. Clasificación de hidrogeles .....	15
Figura 3. Compresión mecánica de hidrogeles basados en PAMPS (14).....	19
Figura 4. Deformación por cizalla (a) y reómetro (AR-1000) TA Instruments del ICTP-CSIC (b). .....	20
Figura 5. Ángulo de fase $\delta$ . .....	21
Figura 6. Proceso de obtención de quitosana (33,34).....	25
Figura 7. Estructura química del polisacárido quitosana y sus unidades estructurales: D-glucosamina (GlcN) y N-acetil-glucosamina (Glc-NAc).....	26
Figura 8. Estructura química de la acrilamida (a) y MBAm (b). .....	30
Figura 9. Mecanismo de reacción para la formación de poliacrilamida.....	32
Figura 10. Mecanismo de reacción para la formación de poliacrilamida con agente entrecruzante MBAm. ....	33
Figura 11. Estructura química del ácido acrílico. ....	34
Figura 12. Formación del compuesto intermediario O-acilurea (IEA).....	35
Figura 13. Estructura química del EDAC.....	35
Figura 14. Mecanismo de reacción propuesto para el derivado de quitosana (DCHI). .....	37
Figura 15. Síntesis de hidrogeles en base a derivado de quitosana y poliacrilamida. .....	38
Figura 16. Molde de silicona para la obtención de hidrogeles .....	40
Figura 17. Película delgada representativa para CHI y DCHI.....	45
Figura 18. Hidrogeles G1 formados después de 3 h de reacción.....	46
Figura 19. Hidrogeles G1 secados en estufa a 50 °C. ....	47
Figura 20. Muestra representativa de los hidrogeles liofilizados.....	47
Figura 21. Estructura del derivado de quitosana (DCHI).....	48
Figura 22. Espectro FT-IR de películas de quitosana (CHI) y derivado de quitosana (DCHI). ....	50
Figura 23. Micrografía SEM de la sección transversal de los hidrogeles G1, G2 y G3. Las flechas rojas indican zonas colapsadas de poros.....	52
Figura 24. Micrografía SEM de la sección transversal de los hidrogeles G4 y G5. Las flechas rojas indican zonas de poros colapsados. ....	54

<b>Figura 25. Micrografía SEM de la sección transversal de los hidrogeles G6 y G7....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 26. Comparación del hidrogel G6 seco e hinchado en agua.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 27. Grado de hinchamiento de los hidrogeles G1, G2 y G3. ....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 28. Grado de hinchamiento de los hidrogeles G4 y G5. ....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 29. Grado de hinchamiento de los hidrogeles G6 y G7. ....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 30. Termograma de los hidrogeles G1, G2 y G3 .....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 31. Termograma de los hidrogeles G4 y G5 .....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 32. Termograma de los hidrogeles G6 y G7 .....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 33. Ensayo de compresión mecánica que representa el montaje del hidrogel entre mordazas (a), hidrogel fracturado (b) e hidrogel elástico (c).....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 34. Curvas de deformación vs esfuerzo en ensayos de compresión de los hidrogeles G1, G2 y G3 .....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 35. Curvas de deformación vs esfuerzo en ensayos de compresión de los hidrogeles G4 y G5 .....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 36. Curvas de deformación vs esfuerzo en ensayos de compresión de los hidrogeles G6 y G7 .....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 37. Ensayo de reología de hidrogeles .....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 38. Evolución de <math>G'</math> y <math>G''</math> en función al barrido de deformación aplicado para los hidrogeles G1, G2 y G3. ....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 39. Evolución de <math>G'</math> y <math>G''</math> en función al barrido de deformación aplicado para los hidrogeles G4 y G5. ....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 40. Evolución de <math>G'</math> y <math>G''</math> en función al barrido de deformación aplicado para los hidrogeles G6 y G7. ....</b>	<b>74</b>
<b>Figura 41. Evolución de <math>G'</math> y <math>G''</math> en función de la frecuencia angular de G1, G2 y G3. ....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 42. Evolución de <math>G'</math> y <math>G''</math> en función de la frecuencia angular de G4, G5, G6 y G7.....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 43. Micrografía SEM representativa del hidrogel hinchado en el tiempo (t= 5h). ....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 44. Micrografía SEM representativa de hidrogel hinchado hasta el equilibrio. ....</b>	<b>92</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Composición de hidrogeles</b> .....	42
<b>Tabla 2. Tamaño promedio de poros de los hidrogeles G1 – G7 obtenidos por micrografía SEM.</b> .....	56
<b>Tabla 3 Capacidad de hinchamiento de hidrogeles</b> .....	61
<b>Tabla 4. Propiedades mecánicas de los hidrogeles G1 – G7 obtenidos por ensayo de compresión.</b> .....	69
<b>Tabla 5. Valores de deformación crítica por cizalla de los hidrogeles (<math>\gamma_c</math>).</b> .....	75
<b>Tabla 6. Propiedades viscoelásticas de los hidrogeles G1 – G7.</b> .....	80
<b>Tabla 7. Densidad de entrecruzamiento teórico de los hidrogeles G1 – G7.</b> .....	81



## ABREVIATURAS

AA	Ácido acrílico
AAM	Acrilamida
CHI	Quitosa
CAE	Contenido de agua en el equilibrio
DCHI	Derivado de quitosa
DDA	Grado de desacetilación
DSC	Differential scanning calorimetry
EDAC	Clorhidrato de 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida
$\epsilon$	Deformación por compresión mecánica
FT-IR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
G	Hidrogel
GluN	D-glucosamina
GluNAc	N-acetil-glucosamina
G'	Módulo elástico
G''	Módulo viscoso
HOAc	Ácido acético
h	Horas
Hz	Hertz
H	Grado de hinchamiento o absorción de agua
IEA	Intermediario éster O-acilúrea
k	Kilo ( $10^3$ )
LVR	Rango de viscoelasticidad lineal
MBAm	N, N' - bismetilenacrilamida
$M_p$	Peso molecular de la cadena más abundante
M	Mega ( $10^6$ )
$M$	Torque
NaOAc	Acetato de sodio
PAAm	Poliacrilamida
PSNa	Persulfato de sodio
Pa	Pascal
rad	radianes
s	segundo

SEM	Scanning electron microscopy
$T_g$	Temperatura de transición vítrea
$\sigma_c$	Esfuerzo de compresión máximo
$\gamma$	Deformación por cizalla
$\gamma_c$	Deformación crítica por cizalla
$\delta$	Ángulo de fase
$\tan(\delta)$	Factor de pérdida
$w/v$	relación peso / volumen
$v/v$	relación volumen / volumen
$W$	grado de hinchamiento



## 1. INTRODUCCIÓN

Los hidrogeles son materiales poliméricos que tienen una gran capacidad de absorción de agua, esto se debe a los grupos funcionales hidrofílicos que poseen las cadenas poliméricas conforman una estructura de red tridimensional (3D). Los hidrogeles pueden experimentar cambios reversibles en su volumen en respuesta a estímulos externos como cambio de pH, temperatura, luz, fuerza iónica, reacciones químicas y campos eléctricos. Estas características permiten que los hidrogeles sean usados en el área de la agricultura como superabsorbentes (1–3), absorbentes de colorantes (4), entre otros y en el área de aplicaciones biomédicas como inmovilizadores de enzimas (5,6), sistemas de liberación controlada de fármacos (7–9) y en ingeniería de tejidos (10–13).

En ingeniería de tejidos, para poder reparar algunos de los tejidos como cartílagos, tendones y ligamentos con el uso de hidrogeles, estos deben tener propiedades como con una baja fricción superficial, bajo desgaste, alta resistencia mecánica, alta tenacidad, gran capacidad de absorción de agua, ser biocompatibles y no tóxicos (14,15).

Una alternativa para la síntesis de hidrogeles que tengan potenciales aplicaciones biomédicas, es el uso de polímeros de origen biológico como el almidón, celulosa y quitosana debido a que presentan baja o nula toxicidad, son hidrofílicos, biocompatibles y biodegradables (10,16–18). Se ha reportado en la literatura que la quitosana puede actuar como una matriz extracelular artificial para la regeneración de tejidos. Además, se puede modificar su estructura con el fin de generar derivados de quitosana que puedan presentar nuevas propiedades químicas y ser útiles para la formación de hidrogeles.

El presente trabajo busca caracterizar las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de hidrogeles sintetizados a partir de derivados de quitosana. La evaluación de las propiedades de estos tipos de hidrogeles permitirá obtener información sobre su uso posible en aplicaciones biomédicas.

## **2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

El grado de entrecruzamiento y el grado de hinchamiento en agua de los hidrogeles influye en las propiedades mecánicas, generando así materiales blandos o rígidos. Es así, que se busca el desarrollo de hidrogeles con propiedades mecánicas que permitan obtener materiales elásticos y resistentes para su uso en aplicaciones potenciales como en ingeniería biomédica. El fin de la presente tesis es la obtención de hidrogeles a partir de un derivado de quitosana y evaluar las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de dichos hidrogeles para su posterior evaluación de sus aplicaciones potenciales.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo general:**

Sintetizar hidrogeles derivados de quitosana y caracterizar sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas.

### **3.2 Objetivos específicos:**

- i. Sintetizar hidrogeles a partir de acrilamida.
- ii. Sintetizar derivados de quitosana mediante copolimerización de injerto y caracterizarlos mediante espectroscopía infrarroja (FTIR).
- iii. Sintetizar hidrogeles a partir de acrilamida con el derivado de quitosana obtenido y evaluar sus propiedades fisicoquímicas.
- iv. Estudiar las propiedades mecánicas y reológicas de los hidrogeles desarrollados.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Hidrogeles

Los hidrogeles son materiales que tienen la capacidad de absorber abundantes cantidades de agua. Este alto grado de hidrofiliicidad se debe a la presencia de grupos funcionales que se encuentran distribuidos en toda su estructura tales como amino ( $-NH_2$ ), carboxilo ( $-COOH$ ), amida ( $-NHCO$ ), hidroxilo ( $-OH$ ), entre otros (19). Los hidrogeles se forman por el entrecruzamiento de monómeros o cadenas poliméricas a través de interacciones físicas, iónicas o covalentes (20). En la figura 1, se muestra una imagen representativa de la estructura interna de un hidrogel, en la cual se puede observar los parámetros importantes de la red que incluyen al tamaño de malla ( $\xi$ ), los cuales se pueden ser llenados con un fluido, en muchos casos suelen ser agua,  $\overline{M}_a$  representa el peso molecular de la cadena polimérica entre dos puntos de entrecruzamiento. Finalmente se muestra las interacciones que pueden ocurrir en los sitios de unión de las cadenas poliméricas entrecruzadas como entrecruzamiento, cadenas enredadas y uniones físicas.

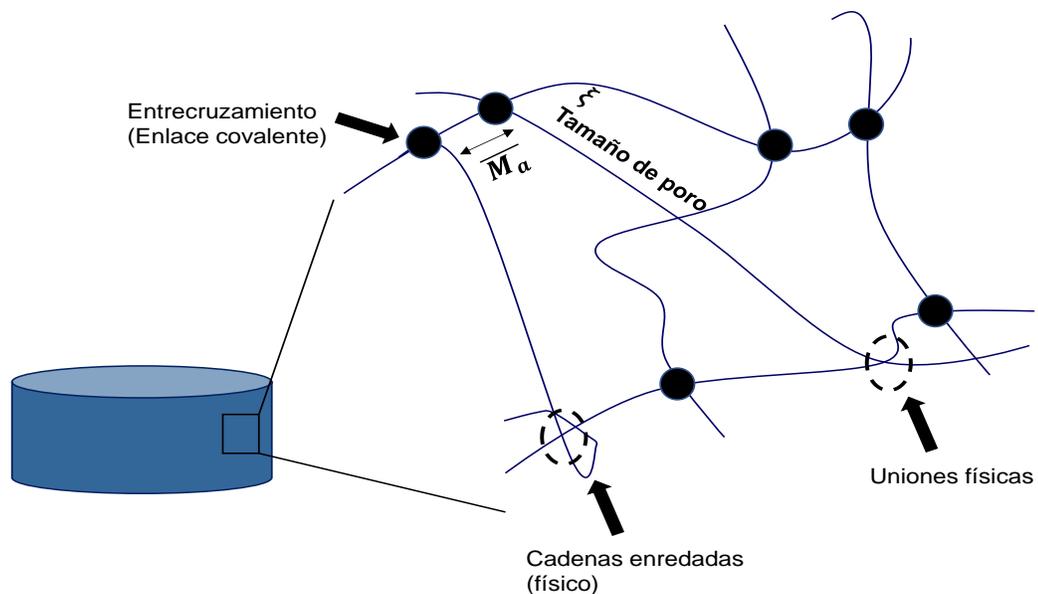
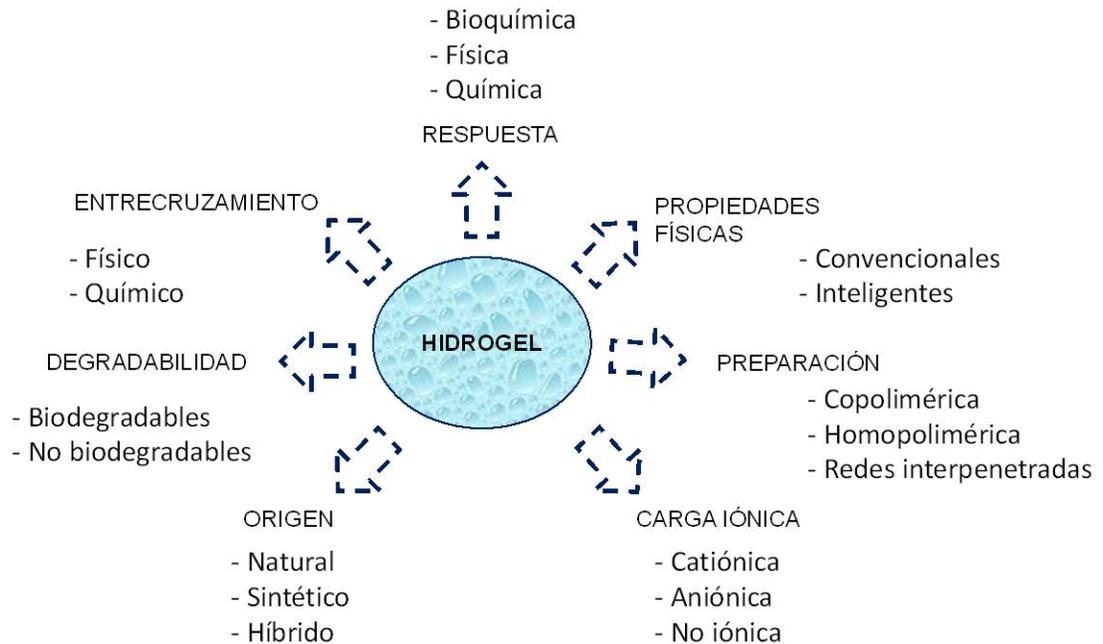


Figura 1. Representación de la estructura de un hidrogel

En el caso de los polímeros usados para la formación de hidrogeles, estos pueden ser sintéticos, semi-sintéticos y naturales. Entre los polímeros naturales más usados para el desarrollo de hidrogeles se pueden mencionar al almidón, celulosa, alginato, colágeno, quitosana entre otros (10), los cuales han llamado la atención debido a sus propiedades biocompatibles, no tóxicas y biodegradables que poseen a diferencias de los polímeros sintéticos.

La clasificación de los hidrogeles puede variar de acuerdo al método de síntesis, al tipo de entrecruzamiento, al origen del polímero, entre otras características (14,26) como se resumen en la figura 2.



**Figura 2. Clasificación de hidrogeles**

En algunos casos, los hidrogeles pueden experimentar cambios reversibles en su volumen en repuesta a estímulos externos como: cambios de pH, temperatura, luz, fuerza iónica, reacciones químicas y campos eléctricos. Esto permiten que los hidrogeles puedan ser considerados como materiales para diversas aplicaciones como absorción de colorantes, inmovilizadores de enzimas, superabsorbentes, en sistemas de liberación controlada de fármacos, en andamios (scaffolds) para ingeniería de tejidos para el desarrollo de bio-órganos artificiales como cartílagos,

tendones, ligamentos, entre otros tejidos que cumplan alguna función en el cuerpo humano (10,15,18,21,22).

#### 4.1.1 Síntesis de hidrogeles

Los hidrogeles se obtienen mediante diferentes rutas de síntesis, dependiendo de la estructura final que se requieren en la aplicación final. Entre estas rutas se puede mencionar vía radiación, entrecruzamiento físico y vía radicales libres.

La polimerización vía radicales libres es un método comúnmente usado para la síntesis de hidrogeles basados en monómeros que incluyen grupos acrilatos, vinílicos y amidas (21). Asimismo, se aplica en la preparación de hidrogeles basados en polímeros naturales, los cuales tienen grupos funcionales o han sido modificados para tener en su estructura grupos que podrían ser polimerizados radicalmente. Las etapas involucradas en la síntesis de hidrogeles por este método son: iniciación, propagación, transferencia de cadena y terminación. Durante la iniciación, se generan los radicales utilizando temperatura (60 - 90 °C), luz en el rango visible o ultravioleta, y mediante agentes redox. Los radicales formados reaccionan con los monómeros de manera que los convierten en sus formas activas. En la etapa de propagación, estos monómeros activos reaccionan con los demás monómeros que se encuentran en la solución, dando como resultado grandes cadenas poliméricas. La terminación de estas reacciones en cadena se puede dar por la transferencia de cadena o a través de la combinación de radicales formando una matriz polimérica (21).

Las condiciones de polimerización mediante el uso de este método dependerán de la solubilidad y reactividad del monómero utilizado, además, de la naturaleza del iniciador utilizado.

Para la síntesis final del hidrogel por este método, durante la reacción se agrega un agente bi-funcional para lograr el entrecruzamiento *in situ* de las cadenas poliméricas. Es preciso recalcar que para este tipo de síntesis es necesario seleccionar el agente de entrecruzamiento apropiado. Podrían surgir complicaciones durante la síntesis si se usa un agente de entrecruzamiento con una

reactividad diferente a la del monómero. Esta diferencia podría generar la formación de un hidrogel con matriz heterogénea. Uno de los agentes de entrecruzamiento más utilizados es el N,N'-Metilen-bis-acrilamida (BIS), especialmente para la síntesis de hidrogeles basados en monómeros de acrilamida (23).

#### 4.1.2 Propiedades de los hidrogeles

Las propiedades de los hidrogeles están relacionadas a la estructura interna y por lo tanto a los grupos funcionales de las moléculas involucradas en el proceso de síntesis, los cuales son cruciales para obtener hidrogeles con una variedad de propiedades.

##### 4.1.2.1 Expansión de su volumen e hinchamiento hasta el equilibrio

La cantidad absorbida de agua por un hidrogel es crucial en la determinación de sus propiedades fisicoquímicas. Como se ha mencionado, los hidrogeles pueden absorber grandes cantidades de agua en su estructura. Esta capacidad de hinchamiento en los hidrogeles es un proceso complejo que comprenden una serie de etapas (24). En la primera etapa los grupos hidrofílicos más polares de la matriz del hidrogel son hidratados por las moléculas de agua, lo cual resulta en la forma de uniones primarias de las dichas moléculas de agua o conocidas como agua asociada. En la segunda etapa, las moléculas de agua también interaccionan con los grupos funcionales hidrofóbicos expuestos a lo largo de las cadenas poliméricas, lo cual es denominado uniones secundarias o agua no asociada. Las uniones primarias y secundarias son considerados como la cantidad total de agua enlazada. En la siguiente etapa, se absorbe una cantidad adicional de agua debido a la presión osmótica de la red hacia la dilución infinita. El agua absorbida en el estado de equilibrio se denomina agua libre, la cual llena los espacios entre la red o las cadenas y el centro de los poros más grandes (25).

La cantidad de agua absorbida por un hidrogel depende de la temperatura y la interacción específica entre las moléculas de agua y las cadenas poliméricas, lo que puede explicarse por la teoría de Flory-Huggins. La energía libre de la mezcla ( $\Delta G_m$ ) entre las cadenas poliméricas y las moléculas de agua se expresa por la siguiente ecuación:

$$\Delta G_m = kT[n_w \ln \phi_w + \ln(1 - \phi_w) + \chi n_w(1 - \phi_w)]$$

Dónde:

$k$  = Constante de Boltzmann

$T$  = Temperatura absoluta

$\chi$  = Parámetro de interacción aparente (moléculas de agua-cadenas poliméricas) que depende de la estructura química del polímero y puede ser calculado de manera experimental mediante la absorción de agua hasta el equilibrio de la red en presencia de una fase de vapor de agua.

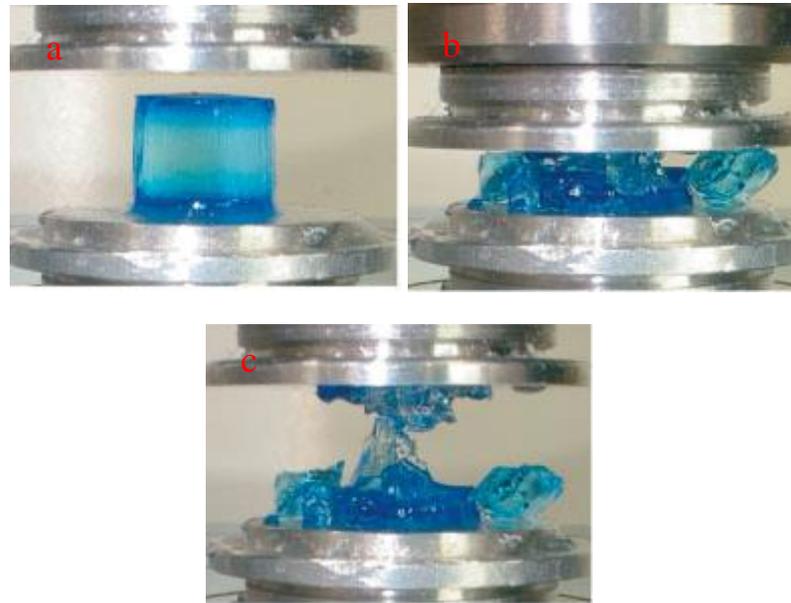
$n_w$  = Número de moléculas

$\phi_w$  = Volumen de agua

Cabe resaltar que las interacciones entre las moléculas de agua y las cadenas poliméricas en un hidrogel se ven afectados por la estructura de los monómeros, por el tipo y densidad de entrecruzamiento, la fuerza iónica y el pH del medio acuoso (24,26).

#### 4.1.2.2 Propiedades mecánicas

En aplicaciones donde se requiere el uso de hidrogeles para la reparación o reemplazo de tejidos, estos biomateriales deben cumplir con ciertas características: tener una baja fricción superficial, bajo desgaste, alta resistencia mecánica, alta tenacidad, además de tener una gran capacidad de absorción de agua (27). J. Gong y Y. Katsuyama (14) desarrollaron hidrogeles a base de un copolímero PAMPS poly(ácido-2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico) y reportaron las propiedades mecánicas. Los hidrogeles como se muestra en la figura 3a, absorben agua y al someterse bajo compresión, su estructura no soporta grandes cargas mecánicas como muestran en la figura 3b y 3c.



**Figura 3. Compresión mecánica de hidrogeles basados en PAMPS (14).**

El grado de entrecruzamiento de hidrogel influencia en las propiedades mecánicas de los hidrogeles. En la síntesis de hidrogeles, el incremento del agente de entrecruzamiento incrementa dicho grado generando una red polimérica más rígida y frágil. Por otro lado, el grado de hinchamiento en agua de los hidrogeles brinda flexibilidad convirtiéndolos en materiales blandos, los cuales no tienen buena resistencia a la compresión mecánica y se fracturan a bajos niveles de carga como se muestra en la figura 3.

A partir de lo mencionado, surge la necesidad de generar nuevos estudios para la síntesis de hidrogeles que puedan soportar grandes cargas de tensión o deformación y así poder ser considerados materiales con potenciales aplicaciones biomédicas.

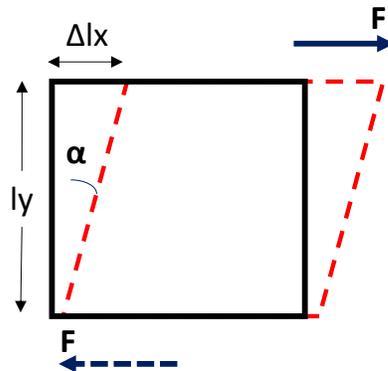
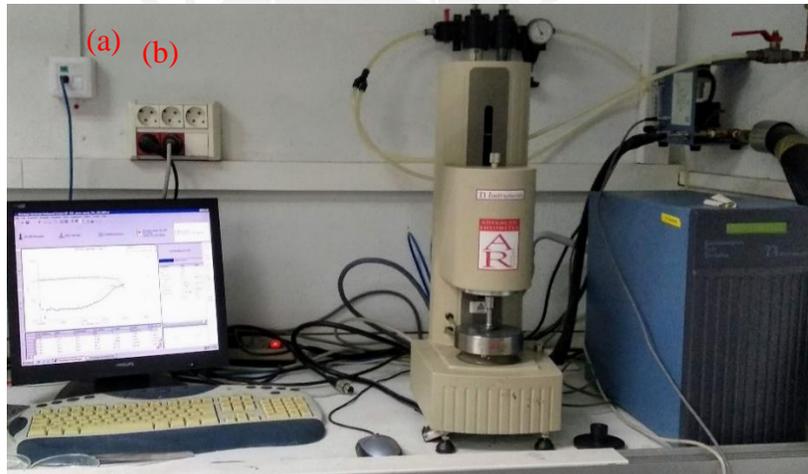
#### 4.1.2.3 Reología de hidrogeles:

Los hidrogeles destinados a ser usados en ingeniería de tejidos necesitan tener la capacidad de imitar o replicar las propiedades viscoelásticas de los tejidos estudiados (28). Cabe resaltar que las propiedades reológicas tienen un gran efecto sobre la procesabilidad y las propiedades finales de un producto, es decir, que dependiendo de la aplicación final del producto, es importante estudiar el flujo y el comportamiento de deformación de los materiales y cómo reaccionan en el ambiente final (29).

La reología estudia el flujo y deformación de los materiales, y describe el comportamiento de estos. Además, Las propiedades reológicas están relacionados con la estructura molecular de las cadenas poliméricas entrecruzadas que conforman a la red tridimensional (28–30).

Para llevar a cabo estudios de reología se requieren un reómetro (figura 4a) en donde la deformación de cizalla aplicada permite conocer las respuestas elástica y viscosa de los materiales. La deformación de cizalla es cuando se aplican esfuerzos cortantes a la muestra, esta sufre una deformación ( $\gamma_x$ ) como se muestra en la figura 4b. Dicha deformación es igual a la proporción de la distancia del plano desplazado transversalmente ( $\Delta l_x$ ) y el espesor ( $l_y$ ). Además, esta relación es igual a la tangente del ángulo  $\alpha$  como se muestra:

$$\gamma_x = \frac{\Delta l_x}{l_y} = \tan \alpha$$



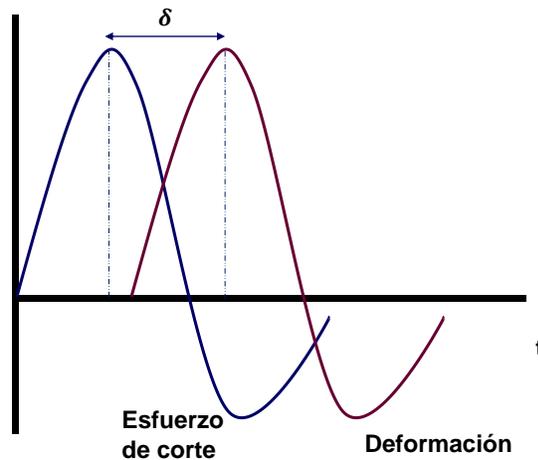
**Figura 4. Deformación por cizalla (a) y reómetro (AR-1000) TA Instruments del ICTP-CSIC (b).**

La escala de tiempo de estas pruebas se define por la frecuencia de oscilación. Se aplica una tensión sinusoidal a la muestra en un rango de frecuencias y se mide la deformación y el ángulo de las fases resultantes (29). Las propiedades monitoreadas en función del tiempo que son críticas para el estudio de hidrogeles son el módulo de almacenamiento ( $G'$ ), el módulo de pérdida ( $G''$ ) y la  $\tan(\delta)$ .

El módulo de almacenamiento o módulo elástico,  $G'$ , es definido como la relación entre las amplitudes del esfuerzo de corte ( $\sigma_0$ ) y de la deformación ( $\gamma_0$ ) que se encuentran en fase, y se calcula de la siguiente función coseno:

$$G' = \frac{\sigma_0 \cos(\delta)}{\gamma_0}$$

Dónde  $\delta$  es el ángulo de fase (figura 5) entre el esfuerzo de corte y la deformación como se muestra a continuación:



**Figura 5. Ángulo de fase  $\delta$ .**

De manera similar, se define el módulo viscoso o módulo de pérdida  $G''$  que es la relación entre las amplitudes del esfuerzo de corte y de la deformación que se encuentran en fase, y se calcula de la siguiente función seno:

$$G'' = \frac{\sigma_0 \sin(\delta)}{\gamma_0}$$

Estas funciones descritas presentan un sentido físico. El módulo  $G'$  está relacionado con la medición de la energía de deformación almacenada en la muestra durante el proceso de cizalla. Esta energía está completamente disponible después que la carga aplicada es removida y actúa como la fuerza que compensa parcial o totalmente la deformación anterior. Si la muestra en estudio permanece sin cambios en los valores de los módulos  $G'$  y  $G''$  después de que se retira la carga, y muestra un comportamiento de deformación reversible (*reversible stress softening*), se denomina que es un material de almacenamiento de energía (29).

Por otro lado, el valor del módulo  $G''$  es una medición de la energía de deformación utilizada en la muestra durante el proceso de cizalla y se pierde después de que se retira la carga, es decir es la energía disipada del sistema. Esta energía se usa durante el proceso de cambios que ocurre en la estructura interna de la muestra estudiada o se desperdicia en el ambiente circundante en forma de calor. Si la muestra se encuentra en una forma modificada después del ciclo de carga, entonces se evidencia un comportamiento de deformación irreversible y se considera como un material que pierde energía. Esta relación con la energía de disipación es una medida del carácter viscoso del material (29).

La relación entre los módulos  $G'$  y  $G''$  nos da información del factor de pérdida o la tangente de desfase  $\tan(\delta)$ :

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'}$$

El desfase que ocurre entre el esfuerzo y la deformación es representado por  $\delta$  (ver figura 5.), el cual es un parámetro que indica la relación entre la energía disipada y almacenada por el material y de la viscoelasticidad del mismo.

Los valores de  $\tan(\delta)$  están en un rango de  $0 \leq \tan(\delta) \leq \infty$  debido a que los valores de  $0 \leq \delta \leq 90^\circ$ . De esta manera se pueden dar los siguientes casos:

- $\delta \approx 0$ : Si en un material el esfuerzo y la deformación están en fase, tendrá comportamiento elástico.

- $\delta \approx 90^\circ$ : Si en un material el esfuerzo y la deformación están en desfase tendrá comportamiento viscoso.
- $0 < \delta < 90^\circ$ : Si el material presenta un desfase entre estos valores, entonces su comportamiento será viscoelástico.

#### 4.1.5 Aplicaciones en Ingeniería de tejidos

Cada año, existen millones de pacientes que sufren daños en órganos o tejidos que son causados por accidentes o diversas enfermedades. Por ejemplo, una vez dañado el cartílago articular, este no tiene la suficiente capacidad de regenerarse o de curarse espontáneamente debido a su naturaleza avascular (31). Aunque el reemplazo o trasplante de dichos órganos o tejidos puede ser una opción, este se ve limitado por la escasez de donantes (15).

El término de “*Ingeniería de tejidos*” fue definido originalmente en 1988 como “*La aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y ciencias de la vida empleados para la comprensión fundamental de la relación estructura-función en tejidos normales y patológicos de mamíferos y el desarrollo de sustitutos biológicos para la reparación o regeneración de la función de tejido u órgano*” (32). En otras palabras, el campo de ingeniería de tejidos implica la mejora o el reemplazo de órganos o tejidos específicos usando materiales de ingeniería y estrategias sintéticas.

En el campo de ingeniería de tejidos, los hidrogeles pueden ser utilizados como materiales de relleno, sistemas de suministro de sustancias bioactivas o como estructuras tridimensionales que actúan como soporte de las células y presentan estímulos para asegurar el desarrollo de un tejido requerido. En este sentido, los hidrogeles utilizados en las aplicaciones mencionadas son llamados biomateriales. Dichos biomateriales son definidos como materiales destinados a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo (*Sociedad Europea de Biomateriales*).

Los biomateriales que son empleados en ingeniería de tejidos necesitan cumplir con ciertos requerimientos:

- **Biocompatibilidad:** Este criterio es crucial para cualquier material que será empleado no solo en aplicaciones de ingeniería de tejidos, si no en cualquier aplicación biomédica. La biocompatibilidad se puede definir como la habilidad de un material para interactuar con órganos del cuerpo sin generar ningún efecto dañino hacia los tejidos con los cuales se encuentra en contacto.
- **Biodegradabilidad:** Uno de los objetivos en ingeniería de tejidos es permitir que las propias células del cuerpo, con el tiempo, reemplacen eventualmente el biomaterial implantado. Debido a esto el biomaterial debe ser biodegradable para permitir que las células en contacto produzcan su propia matriz extracelular. Además, es necesario que los subproductos de dicha degradación no sean tóxicos y puedan ser eliminados del cuerpo sin interferir con algún otro órgano.
- **Propiedades mecánicas:** Idealmente, los biomateriales deben tener propiedades mecánicas similares al sitio anatómico en el cual se van a implantar y ser lo suficientemente consistentes en su estructura para soportar el manejo quirúrgico durante la implantación. Uno de los desafíos actuales en este campo es la síntesis de biomateriales con propiedades mecánicas adecuadas para la reparación de huesos, tejidos u órganos dañados (10).

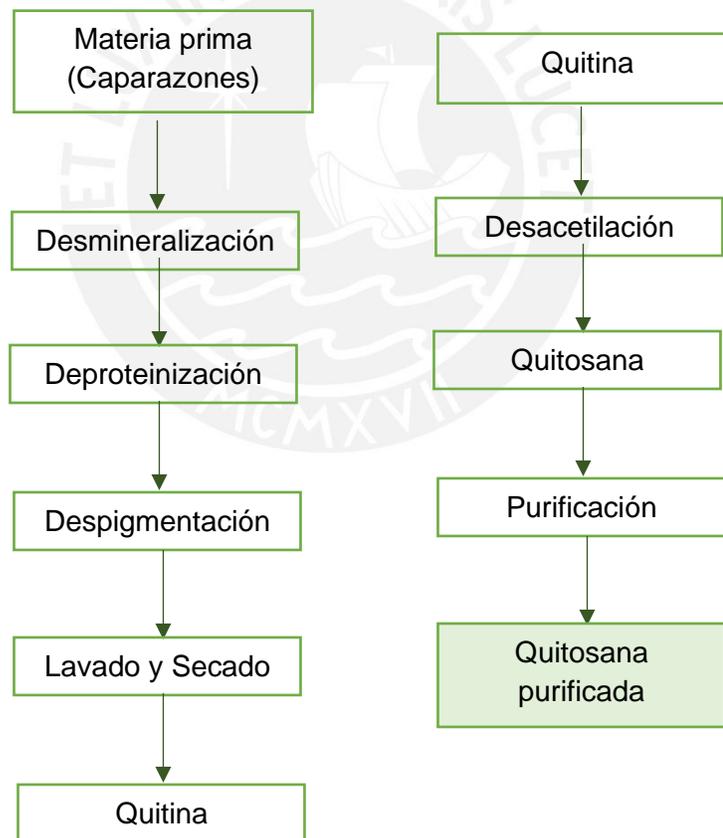
Diversos autores reportan el uso de polisacáridos como alginato, celulosa, almidón, gelatina, colágeno, quitina, quitosana, entre otros, para la obtención de hidrogeles con potenciales aplicaciones en ingeniería de tejidos (10,15,18). Dentro de los polisacáridos mencionados, se destaca el uso de la quitosana, por sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradación y su alta actividad antimicrobiana que serán mencionadas a detalle en la siguiente sección.

## 4.2 Quitosana

La alternativa que presenta el uso de polímeros naturales, especialmente polisacáridos, frente a polímeros sintéticos para el desarrollo de hidrogeles se debe a su abundancia, bajo costo, biodegradabilidad y otras características que han impulsado el procesamiento de polisacáridos como el almidón, carragenina, pectina, goma arábica, quitina, quitosana, entre otros.

### 4.2.1 Obtención de la quitosana

La quitosana es un copolímero natural que proviene de la desacetilación de la quitina, la cual se obtiene del exoesqueleto de crustáceos e insectos, entre otros artrópodos. La fuente más común de extracción de quitina es a partir de los caparazones de crustáceos como cangrejos y langostinos (33).

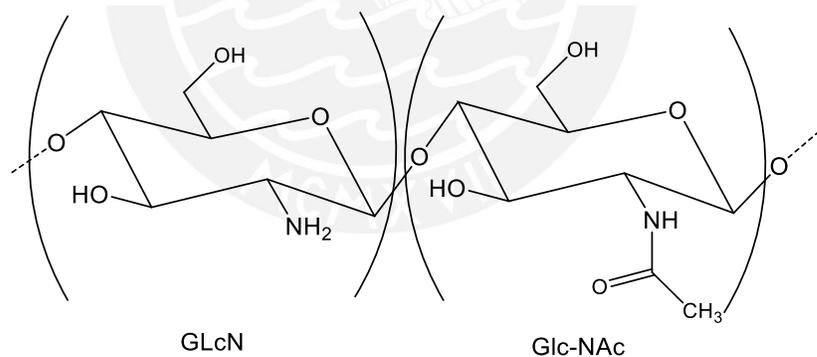


**Figura 6. Proceso de obtención de quitosana (33,34).**

La figura 6 presenta de manera general los pasos para la extracción de la quitosana. Los caparazones contienen proteínas, pigmentos, lípidos y materiales inorgánicos como carbonato de calcio. Debido a esto se debe realizar una serie de pasos para poder extraer la quitina y a partir de ella obtener la quitosana (33,34). Las variaciones que ocurren durante todo el proceso de obtención de la quitosana desde el origen de la materia prima hasta el tiempo y método de desacetilación empleado, serán relevantes en sus propiedades finales.

#### 4.2.2 Composición y estructura química

Estructuralmente, como se muestra en la figura 7, la quitosana es un polisacárido lineal que consiste en unidades de D-glucosamina (GlcN) y N-acetil-glucosamina (GlcN-Ac) unidas a través de  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) enlaces glucosídicos (35). Sus propiedades físicas y químicas dependen de dos principales parámetros: peso molecular y el grado de desacetilación (DDA) (36). El DDA es la proporción de grupos aminos ( $-\text{NH}_2$ ) libres en sus dos unidades de repetición (37), es decir, indica la proporción que existe entre las dos unidades estructurales GlcN y Glc-NAc de la quitosana. La quitina tiene un valor de DDA menor o igual al 10 % (38).



**Figura 7. Estructura química del polisacárido quitosana y sus unidades estructurales: D-glucosamina (GlcN) y N-acetil-glucosamina (Glc-NAc).**

Diversos autores han reportado el uso de la quitosana en sistemas de liberación controlada de fármacos, en el desarrollo de biomateriales para ingeniería de tejidos, empaques de alimentos, entre otras aplicaciones debido a la biocompatibilidad, biodegradabilidad, las propiedades antimicrobianas y a la no toxicidad que presenta (31,39,40). Se ha reportado el uso de la quitosana para desarrollar diferentes materiales como perlas, membranas, esponjas, fibras, films, geles (38). Además, la

quitosana tiene una estructura parecida a los glicosaminoglicanos, los cuales forman parte de la matriz extracelular de los tejidos naturales. La quitosana es considerada uno de los biopolímeros más prometedores para ser usados en la elaboración de hidrogeles, los cuales pueden actuar como una matriz extracelular artificial para la regeneración de tejidos (36). Sin embargo, su especial solubilidad (soluble en soluciones ácidas diluidas) y su alta viscosidad, condicionan su uso sin antes modificar su estructura (41,42). Basados en las características que presenta la quitosana, varios autores han propuesto diferentes alternativas de modificación que incluyen su combinación con otros polímeros como poliacrilamida, polietilenglicol, polivinilalcohol (42–44). Así como también modificar sus grupos funcionales hidroxilo y amina que posee en su estructura, ya que son convenientes para su modificación con monómeros vinílicos hidrofílicos, carboxílicos, entre otros (45). De esta manera facilitan la formación de derivados de quitosana y así la obtención de una variedad de compuestos, los cuales son convenientes para su uso en la elaboración de hidrogeles (45).

#### 4.2.3 Derivados de quitosana

Existe un gran interés en la modificación química de la quitosana a fin de incrementar su solubilidad para ampliar su uso en diferentes aplicaciones (46). Entre las diferentes técnicas de modificación química de la quitosana se encuentran (47–49): acilación, hidroxilación, sulfonación, fosforilación y la copolimerización de injerto o *graft copolymerization* (por su término en inglés), siendo esta última técnica la más usada para la obtención de derivados de quitosana mediante la formación de un enlace covalente entre una molécula, el injerto, y la estructura de la quitosana (47). La quitosana tiene dos grupos reactivos que pueden ser involucrados en una modificación por injerto. Primero, están los grupos amino ( $-NH_2$ ) de las unidades desacetiladas (GlcN-Ver figura 2). Los otros son los grupos hidroxilos ( $-OH$ ) que se encuentran ubicados en los carbonos  $C_3$  y  $C_6$  de las unidades acetiladas y desacetiladas respectivamente (Ver figura 7).

A partir de las modificaciones por injerto que se pueden realizar en la estructura de la quitosana, se incrementa su solubilidad, su capacidad de adsorción y su efecto

bacteriostático (47). Además, es posible mantener otras propiedades como mucoadesividad, biocompatibilidad y biodegradabilidad.

#### 4.2.4 Propiedades y usos

La quitosana presenta propiedades como biocompatibilidad, biodegradabilidad (además sus productos de degradación no son tóxicos), se obtiene de fuentes renovables, naturaleza adhesiva, posee propiedades antifúngicas y antimicrobianas, entre otros (31,39,50). Todo este conjunto de características hacen que los biomateriales basados en quitosana tengan aplicaciones potenciales en la formulación de plásticos biodegradables, recubrimientos para preservar alimentos, en tratamiento de aguas, desechos contaminados y en hasta aplicaciones biomédicas que incluyen la formulación de micro y nanopartículas, vendajes para heridas en la piel y quemaduras de tercer grado (50–52).

#### 4.2.5 Hidrogeles basados en quitosana

Con el propósito sintetizar hidrogeles que puedan ser usados en aplicaciones biomédicas, diversos autores proponen la combinación de las propiedades de polímeros naturales (biocompatibilidad, no toxicidad y citocompatibilidad) con las de polímeros sintéticos (alta resistencia mecánica) para la formación de hidrogeles (15,21,53). En este contexto, se ha reportado la elaboración de hidrogeles en base a quitosana con polímeros sintéticos como poli(alcohol vinílico) (13,54,55), polietileno (56) y poliacrilamida (42,57,58). Bocourt et al. (59) propusieron que la relación de absorbancias  $A_{1655}/A_{1082}$  puede utilizarse para conocer la composición relativa de hidrogeles interpenetrados de quitosana y poliacrilamida. Asimismo, reportan que este tipo de hidrogeles se hinchan rápidamente y que la cinética de hinchamiento está controlada por la relajación de las cadenas poliméricas. Stela et al. (4,60) estudiaron la influencia del pH de la reacción, proporción de entrecruzador y la masa molar de la quitosana sobre la morfología de hidrogeles interpenetrados teniendo como matriz a poliacrilamida y cadenas poliméricas de quitosana atrapadas en dicha matriz. Xu et al. (57) evaluaron la citotoxicidad y la hemólisis de hidrogeles a base de quitosana y poliacrilamida. Este tipo de hidrogeles puede absorber células de glóbulos rojos en su estructura, lo que muestra una baja toxicidad contra células HeLa, además de hemocompatibilidad y biocompatibilidad. Además, Markarand et al. (61) evaluaron la capacidad de este tipo de hidrogeles para la liberación controlada de antibióticos.

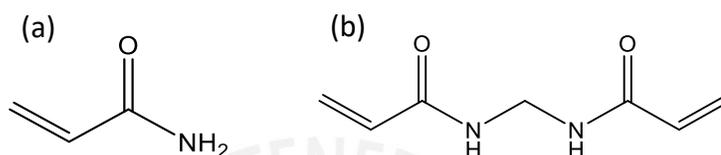
Otro importante parámetro de estudio que influye en las propiedades mecánicas de los hidrogeles es el tamaño de poro, que puede ser caracterizado usando la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM). En el caso del desarrollo de hidrogeles con superporos ( $> 100 \mu\text{m}$ ), estos tienen la ventaja de tener un rápido hinchamiento debido al tamaño de sus poros interconectados, sin embargo, la mayor desventaja es su baja resistencia mecánica (62). Algunos estudios han propuesto estrategias a base de quitosana con poliacrilamida (62) y poli (ácido acrílico-co-acrilamida) (62–64) para mejorar las propiedades mecánicas y evaluar la capacidad de carga de diferentes fármacos .

Por otro lado, Bocourt et al. (65) estudiaron la estabilidad térmica, la capacidad de hinchamiento y el efecto del pH en hidrogeles basados en poli (acrilamida-co-acido itacónico) y quitosana. Su estudio determinó que este tipo de hidrogeles son sensibles al pH y que podrían tener aplicaciones en biomedicina como en la liberación de proteínas. Lejardi et al. (55) elaboraron hidrogeles en base a quitosana-poli(alcohol vinílico)-g-ácido glicólico a temperaturas fisiológicas. Los resultados obtenidos mostraron materiales con propiedades elásticas mejoradas que pueden ser empleados en aplicaciones biomédicas. Finalmente, Zhou et al. (13) evaluaron las propiedades mecánicas de hidrogeles en base a anhídrido maleico-quitosana y poli(alcohol vinílico). Estos materiales exhibieron valores de módulos de compresibilidad de 0,285 MPa, que son cercanos a los de un tejido natural como es el de un tejido de cartílago bovino (0,35 MPa), lo que indica que este tipo de materiales tiene una potencial aplicación en el desarrollo de scaffolds para la reparación de cartílagos.

Se encuentra en la literatura que se han sintetizado de diferentes formas hidrogeles basados en quitosana, acrilamida, ácido acrílico y entre otros compuestos. Sin embargo, la falta de entendimiento de las propiedades reológicas de hidrogeles basados en derivados de quitosana y nuevas propuestas de síntesis o modificaciones que permitan encontrar un equilibrio entre la capacidad de hinchamiento y la resistencia mecánica de dichos materiales sigue siendo un tema de estudio, el cual se abarca en la presente tesis.

### 4.3 Acrilamida

La acrilamida es un monómero muy utilizado en la síntesis de hidrogeles (64,66–69). Su estructura química se muestra en la figura 8a, en la cual se muestra que tiene grupos funcionales como carboxilo y metileno. Este último es el más reactivo para realizar polimerizaciones mediante iniciación vía radicales libres o radiación y dar como resultado a la poliacrilamida (70,71). Para obtener esta última, PAAm, puede utilizarse N, N'- bismetilenacrilamida (MBAm) como agente entrecruzante (ver figura 8b).



**Figura 8. Estructura química de la acrilamida (a) y MBAm (b).**

#### 4.3.1 Poliacrilamida

La síntesis de poliacrilamida (PAAm) puede ocurrir en presencia de un agente entrecruzante o sin agente. En los dos casos, el mecanismo de síntesis de PAAm se da vía radicales libres y se lleva a cabo en tres etapas (iniciación, propagación y terminación), las cuales se muestran en la figura 9 (59,71,72) y se detallan a continuación:

- i. **Iniciación:** en esta etapa se generan los radicales libres a partir de las cantidades iniciales de persulfato de sodio y calor. El rango de temperatura más adecuada para este paso es 60-70 °C, debido a que temperaturas más bajas la reacción es más lenta y a temperaturas más altas la reacción es muy violenta. Una vez activados los iniciadores, estos reaccionan con las moléculas de acrilamida para generar más radicales.
- ii. **Propagación:** Una vez que se forman los radicales libres a partir del persulfato de sodio y las moléculas de acrilamida (AA), estos reaccionan con las demás unidades presentes de AA para empezar a formar cadenas lineales basadas en uniones repetitivas de dichas moléculas (73,74) como se muestra en la figura 10. En el caso que la reacción contenga moléculas de agente entrecruzante, este se une con las moléculas de acrilamida de manera que puede ser un

conector entre moléculas de AA y cadenas lineales de AA como se muestra en la figura 11.

- iii. Terminación: Es la etapa final del proceso de polimerización para la formación de hidrogeles de poliacrilamida. Se puede dar por diferentes vías: por combinación o disproporción o transferencia de cadena.

Es así que dependiendo de la presencia del agente entrecruzante, como por ejemplo usando MBAm (ver figura 9), en la síntesis de poliacrilamida, se obtendrá diferentes estructuras como se presentan en las figuras 9 y 10.



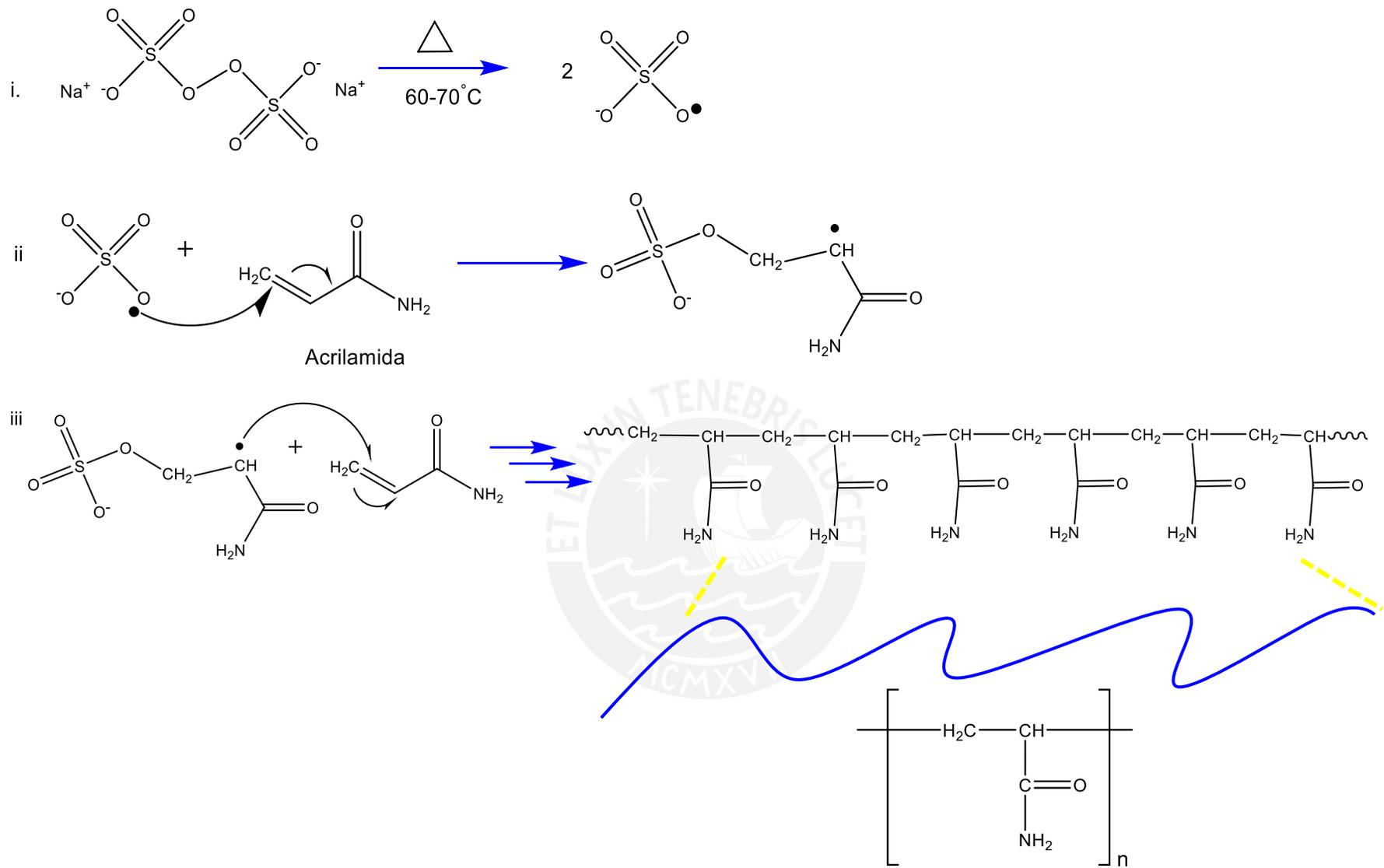


Figura 9. Mecanismo de reacción para la formación de poliacrilamida.

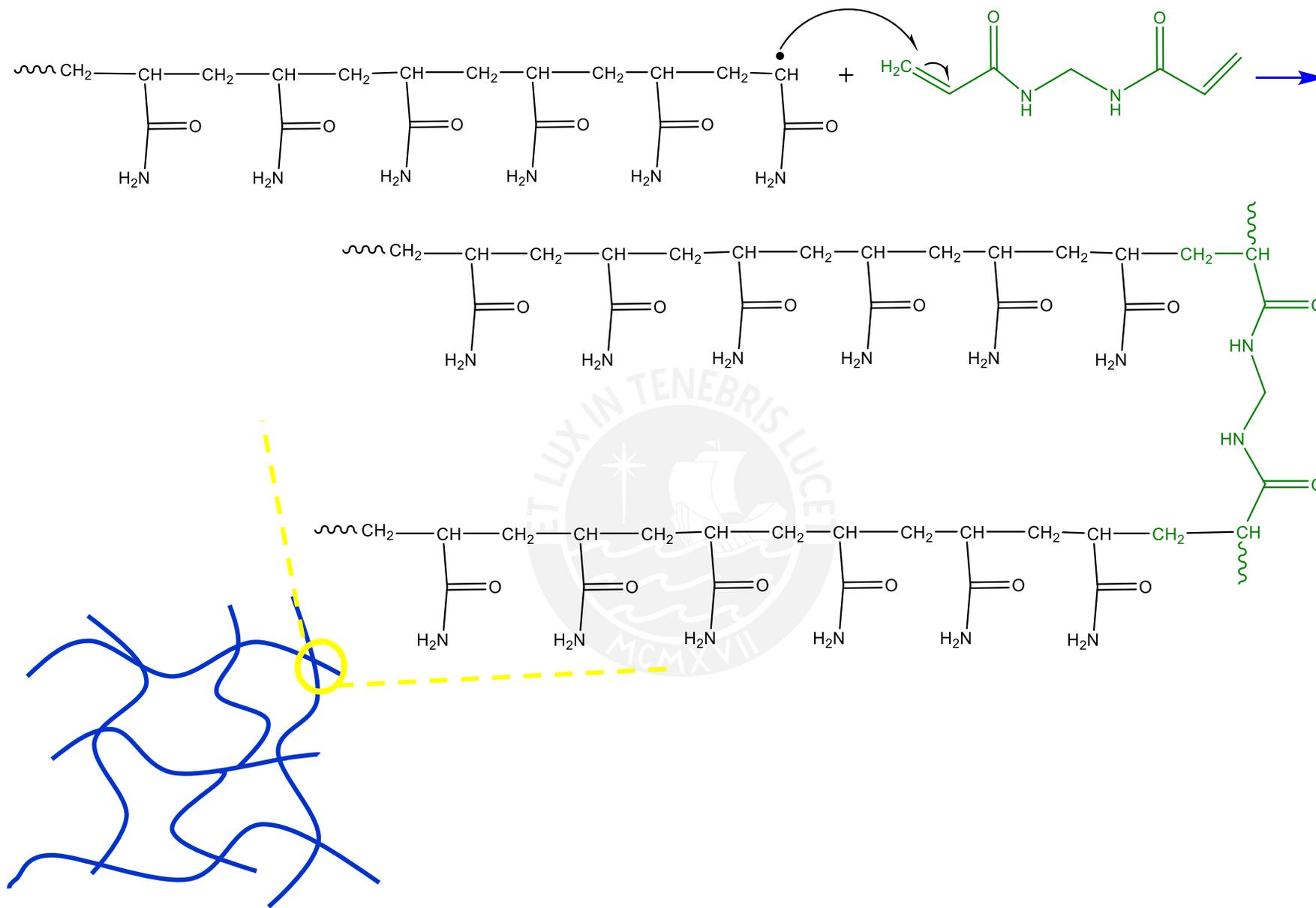


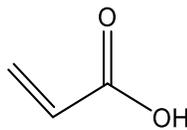
Figura 10. Mecanismo de reacción para la formación de poliacrilamida con agente entrecruzante MBAm.

La poliacrilamida es uno de los polímeros sintéticos más usados para el desarrollo de hidrogeles para aplicaciones biomédicas debido a su naturaleza bio-inerte, hidrofílica, su afinidad por las proteínas y otra biomoléculas (4).

Los estudios presentados por Karadag et al. (75), y Saraydin et al. (76), demostraron que los hidrogeles desarrollados partir de poliacrilamida son biocompatible al no presentarse infecciones con los tejidos involucrados en los estudios in vitro. Al estar polimerizada, la poliacrilamida conserva su propiedades hidrofílicas y la capacidad de aumentar su volumen (59) en presencia de una solución acuosa. por lo que es ampliamente utilizada para la formación de hidrogeles en la presencia de otros polímeros sintéticos o naturales. Bodugoz et al. (66), estudiaron las aplicaciones potenciales de hidrogeles basados en polivinil alcohol y poliacrilamida como cartílagos articulares sintéticos. Sus resultados reportados muestran que este tipo de hidrogeles tienen buena resistencia a la deformación en el tiempo (*creep deformation*), lo cual nos indica que puede prevenir la inestabilidad mecánica en la unión con el cartílago.

#### 4.4 Ácido acrílico

La estructura del ácido acrílico se muestra en la figura 11, donde se aprecia que tiene dos grupos funcionales, carboxílico y vinílico. Este último grupo es utilizado para que las moléculas sean injertadas en cadenas poliméricas como la de la quitosana.

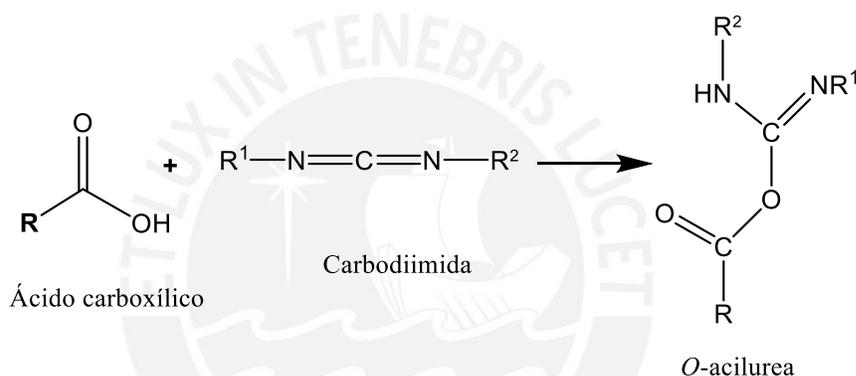


**Figura 11. Estructura química del ácido acrílico.**

Además, este monómero hidrofílico es ampliamente usado para sintetizar hidrogeles superabsorbentes debido al grupo carboxílico ionizable que posee, el cual es sensible al pH. Además, es usado en la síntesis de copolímeros mediante polimerización de injerto (77), lo cual permite obtener una gran variedad de polímeros que pueden ser usados en la formulación de nuevos hidrogeles con propiedades únicas.

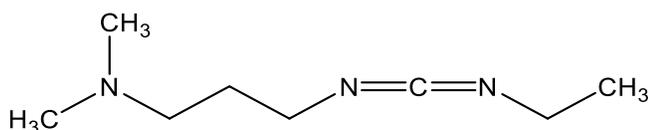
#### 4.5 Agentes de acoplamiento

Cuando los grupos carboxílicos y amino se encuentran ionizados, estos poseen cargas contrarias por lo que pueden interactuar electrostáticamente. Sin embargo, cuando se requiere que estos dos grupos reaccionen para unirse mediante un enlace covalente, es necesario activar los grupos carboxílicos (78). Para dicha activación se puede formar un grupo reactivo *NHS*-éster con una carbodiimida mediante una reacción de dos etapas (78,79). La primera etapa involucra la reacción del grupo ácido y la carbodiimida para formar un compuesto intermediario *O*-acilurea, el cual es inestable y altamente reactivo (figura 12). El segundo paso se da entre este compuesto y un grupo amino que se encuentre cercano, los cuales reaccionan para formar un compuesto conjugado estable.



**Figura 12. Formación del compuesto intermediario *O*-acilurea (IEA).**

Para estos casos, una carbodiimida muy utilizada es el clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida o denominada EDAC. Su estructura se muestra en la siguiente figura 13.



**Figura 13. Estructura química del EDAC**

El EDAC al considerarse como un conector covalente, se ha utilizado para injertar diferentes moléculas con la quitosana como ácido cafeico y evaluar sus propiedades antioxidantes (80), microsporinas para aplicaciones en protección UV (79), aptorinina para el desarrollo de inhibidores de proteasas (81), ácido tioglicólico para

mejorar las propiedades de mucoadhesión de la quitosana (82,83), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) para aplicaciones en sistemas mucoadhesivos de liberación controlada (84), entre otros.

En el caso de injertar ácido acrílico en la estructura de la quitosana, como se propone en este trabajo, el mecanismo de reacción propuesto sería el que se muestra en la figura 14. Inicialmente, el grupo carboxilo del ácido acrílico es activado por el EDAC formando un producto intermediario éster *O*-acilurea, el cual reacciona luego con los grupos amino de la quitosana. Posteriormente, la quitosana queda unida covalentemente al ácido acrílico mediante la formación de enlaces amida. En la figura 14, se puede observar el derivado de quitosana formado, en el cual hay 3 tipos de unidades de glucosamina. La primera contiene el grupo acrilato, que fue resultado de injertar grupos de ácido acrílico. La segunda unidad sería la que contiene grupos aminos libres que no reaccionaron en la polimerización por injerto. Por último, y en menor porcentaje estaría presentes las unidades de N-acetilglucosamina.

En el caso de la formación de hidrogeles derivados de quitosana y poliacrilamida, las unidades de glucosaminas presentes en el derivado de quitosana que interaccionan con la matriz de PAAm, son los que contienen al grupo metileno en el acrilato. De esta manera, si en la formulación de los hidrogeles no se incluye agente de entrecruzamiento, será el derivado de quitosana el cual actúe como entrecruzador uniéndose a la matriz de poliacrilamida (figura 15).

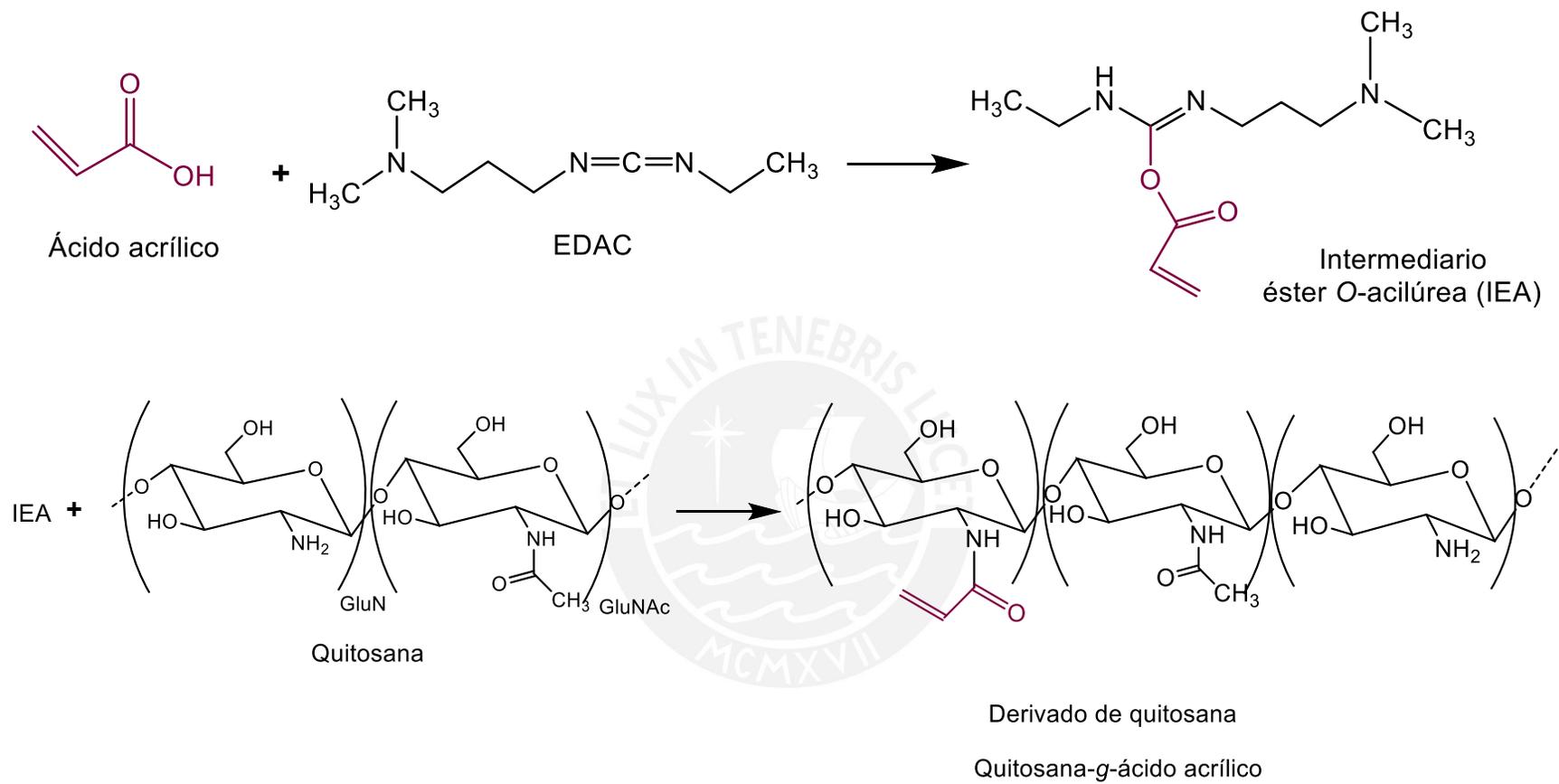


Figura 14. Mecanismo de reacción propuesto para el derivado de quitosana (DCHI).

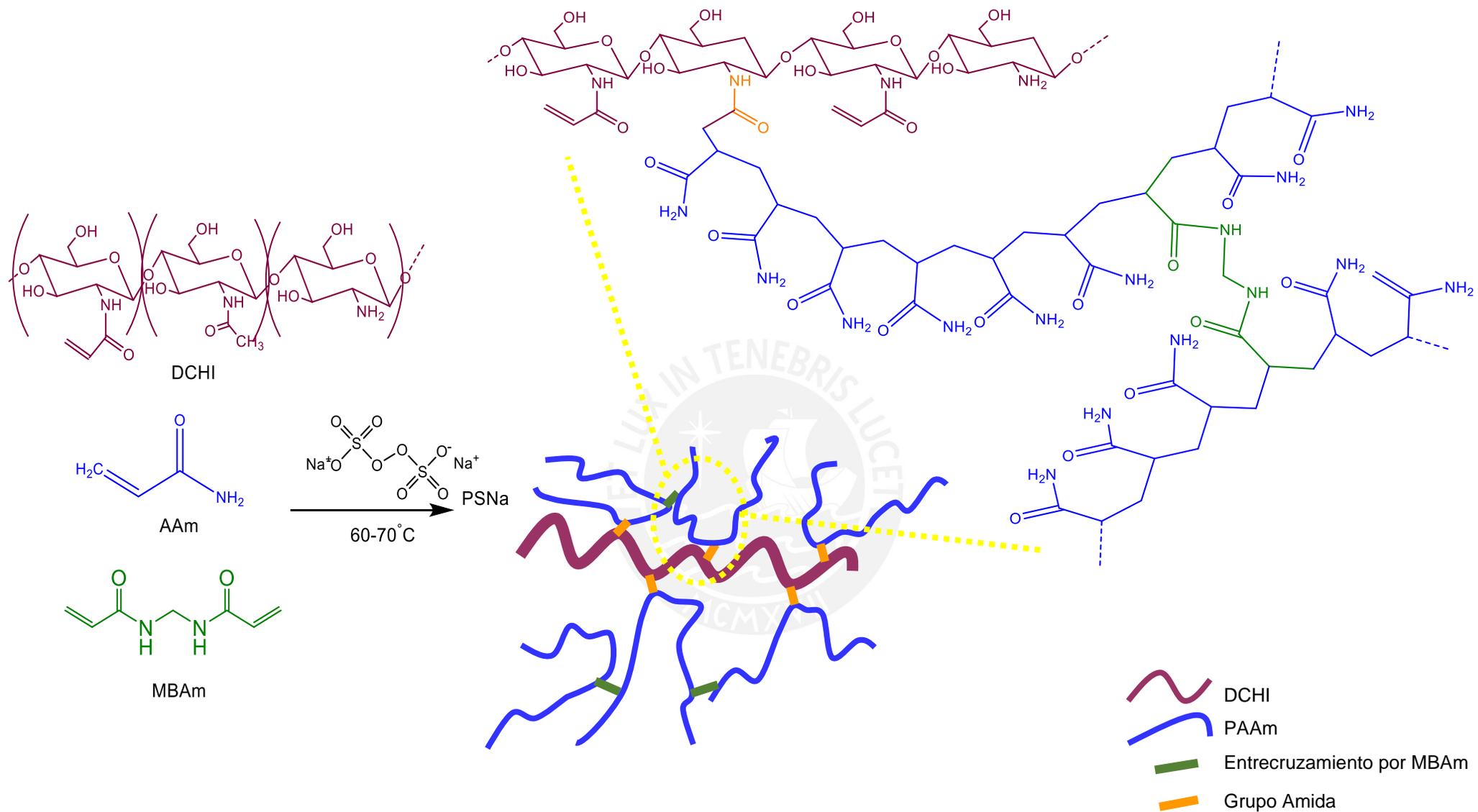


Figura 15. Síntesis de hidrogeles en base a derivado de quitosana y poliacrilamida.

## 5. HIPÓTESIS

Es posible obtener hidrogeles de derivados de quitosana con propiedades fisicoquímicas y mecánicas adecuadas para su uso en aplicaciones biomédicas.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se utilizaron sin purificación previa, a menos que se indique lo contrario.

Quitosana:

- DDA = 99.85%
- Peso molecular de la cadena más abundante ( $M_p$ )= 84 kDa

Sigma-Aldrich:

- N,N'-Metilénbissacrilamida 99%
- Acrilamida 99%
- Hidrocloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDAC) 99%

Merck:

- Ácido acético glacial (HAc) para análisis
- Acetato de sodio trihidratado ( $\text{NaOAc}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) para análisis
- Amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) 25%

J-Baker:

- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) 99,93%

Otros:

- Acido acrílico para síntesis
- Persulfato de sodio para síntesis

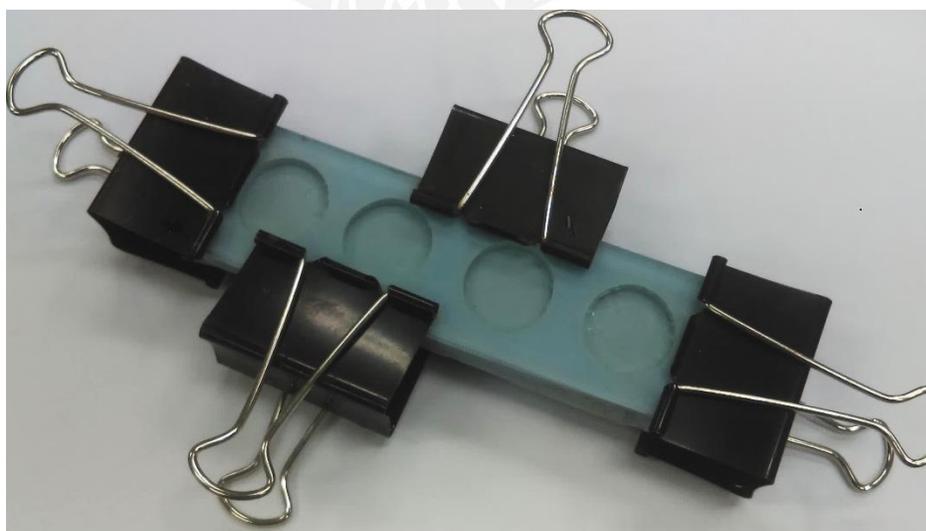
## 6.2 Materiales y Equipos

- Filtros de papel Whatman 4 con tamaño de poro entre 20 y 25  $\mu\text{m}$  y diámetro de 90 mm
- Membrana de diálisis (Spectra/Por, Spectrum Laboratories, Inc.) con diámetro de 29 mm y 12-14 kD como rango de peso molecular del soluto.
- Moldes de silicona
- Liofilizador Labconco modelo 4.5 a  $10^{-2}$  mbar y  $-44\text{ }^{\circ}\text{C}$

## 6.3 Procedimiento

### 6.3.1 Síntesis de hidrogeles de poliacrilamida

Los hidrogeles de poliacrilamida se prepararon mediante polimerización por radicales libres. Se disolvió 62 mmol de acrilamida y 0,032 mmol de N, N'-bismetilenacrilamida en 40 mL de buffer de pH = 4,5 (NaOAc/HOAc) a temperatura ambiente y con agitación constante. A esta solución, se le agregó 400  $\mu\text{L}$  de persulfato de sodio 0,2 M, el cual se preparó a partir de 0,1 mmol en 0,5 mL. Una vez que se añadió el persulfato, se procedió a verter el contenido en un molde de silicona, el cual fue sellado con dos piezas de vidrio en paralelo (ver figura 16). Una vez que se selló el molde con ayuda de 4 pinzas, se introdujo en un baño maría que se encontraba en un rango de 60 – 70  $^{\circ}\text{C}$  por 3 h. La polimerización en este tipo de moldes permitió obtener hidrogeles de dimensiones 2,4 cm de diámetro y 0,55 cm de altura.



**Figura 16. Molde de silicona para la obtención de hidrogeles**

Después de las 3 h, los hidrogeles fueron desmoldados y lavados con agua destilada durante 2 días para remover impurezas. Luego se colocaron en la estufa a 50 °C hasta peso constante y se almacenaron en un desecador a temperatura ambiente.

### 6.3.2 Síntesis de derivados de quitosana

Para la modificación de la quitosana con ácido acrílico, se adaptó el procedimiento reportado por Fernández et al. (46). Primero, se preparó una solución al 1% w/v de quitosana en 25 mL de agua con 1,2 mL (17 mmol) de ácido acrílico con agitación constante por 12 horas a 25 °C. A esta solución se le agregó 0,21 g (1,1 mmol) de EDAC y se mantuvo con agitación constante en un baño maría a 25 °C a oscuras por 4 horas. Luego, se dializó en agua destilada por 48 h, cambiando regularmente la solución de diálisis. Finalmente, el derivado de quitosana se recuperó por liofilización.

### 6.3.3 Síntesis de hidrogeles con derivados de quitosana y poliacrilamida

Esta síntesis se llevó a cabo en 2 pasos. Primero, se preparó una solución al 1% w/v de quitosana en 25 mL de buffer de pH = 4,5 (NaOAc/HOAc) con agitación constante por 12 horas a 25 °C. Posteriormente, se agregó 1,2 mL (17 mmol) de ácido acrílico y 0,21 g (1,1 mmol) de EDAC mediante agitación constante en un baño maría a 25 °C a oscuras por 4 horas. Luego, se agregó 62 mmol de acrilamida y 0,032 mmol de MBAm previamente disueltos en 15 mL del buffer pH = 4,5. Finalmente, a esta solución, se le agregó 400 µL de persulfato de sodio 0,2 M. Una vez que se añadió el persulfato, se procedió a verter el contenido en un molde de silicona (ver figura 16) se introdujo en un baño maría a 60 - 70 °C por 3 h. Las concentraciones de los reactantes utilizados para la síntesis de los hidrogeles se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Composición de hidrogeles**

Hidrogel	AAm (mmol)	MBAm (mmol)	AA (mmol)	EDAC (mmol)	CHI (mmol)
G1	62	0,032	-	-	-
G2	62	0,062	-	-	-
G3	62	0,124	-	-	-
G4	62	0,032	0,291	-	-
G5	62	0,032	0,291	0,1	-
G6	62	0,032	0,291	0,1	0,4
G7	62	-	0,291	0,1	0,4

Según lo reportado en la Tabla 1, todos los siete tipos de hidrogeles G1 – G7 fueron lavados en agua destilada, y dependiendo del tipo de caracterización, los hidrogeles fueron liofilizados o secados a temperatura ambiente y finalmente almacenados en un desecador.

## 6.4 Caracterización

### 6.4.1 Espectroscopia FT-IR

Espectroscopía infrarroja (FTIR-ATR): El equipo empleado fue un espectrofotómetro infrarrojo (FTIR) Perkin Elmer Spectrum One con accesorio de atenuación total de reflectancia (ATR) universal. Los ensayos fueron realizados a una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  y en un rango de número de onda desde  $4000\text{ cm}^{-1}$  hasta  $550\text{ cm}^{-1}$ .

### 6.4.2 Análisis morfológico

Se empleó un microscopio electrónico de barrido o *Scanning electron microscopy* (SEM) Philips XL 30 para el análisis morfológico de los hidrogeles liofilizados. El equipo contó con un filamento de tungsteno y trabajó en modo de alto vacío. Las muestras se metalizaron en un equipo Sputter Coater Polaron SC7640 con blanco de oro-paladio (80/20) y oro.

### 6.4.3 Grado de hinchamiento o absorción de agua

En un vaso de precipitados, se sumergió una porción de hidrogel seco previamente pesada ( $H_s$ ) en 60 mL de agua destilada a temperatura ambiente. El grado de hinchamiento de los hidrogeles se determinó mediante gravimetría, midiendo la cantidad de agua absorbida y el tiempo de inmersión. Es decir, a determinado tiempo se sacó el hidrogel que se encontraba sumergido, se secó la superficie con papel filtro, se pesó y se volvió a sumergir.

El grado de hinchamiento ( $H_{H_2O\text{ absorbido}}$ ) o de absorción de agua de cada hidrogel fue calculado utilizando la siguiente relación:

$$H = \left( \frac{H_h - H_s}{H_s} \right) * 100$$

Donde:

$H$  = es el grado de absorción de agua (g  $H_2O$ /g de hidrogel seco)

$H_h$  = peso del hidrogel hinchado

$H_s$  = peso del hidrogel seco

#### 6.4.4 Análisis térmico

Se utilizó un calorímetro diferencial de barrido o por sus siglas en inglés *Differential scanning calorimetry* (DSC) de la marca Perkim Elmer modelo 4000. Las muestras secas obtenidas por liofilización fueron pesadas (~10 mg) y ensayadas en un rango de temperaturas desde 30 hasta 400 °C con una velocidad de 10 °C/min y bajo atmósfera inerte de nitrógeno.

#### 6.4.5 Caracterización mecánica

Para los ensayos de compresión, se utilizó el equipo de microensayos mecánicos con el lector de fuerza MARK-10 Serie 4L. Las muestras fueron preparadas en moldes de silicona como se muestra en la figura 13. Las muestras analizadas previamente fueron hinchadas hasta equilibrio (hasta obtener un peso constante en la absorción de agua). Luego, fueron cortadas con un troquel de diámetro de 24 mm. La altura promedio de los hidrogeles fue de 5-1 mm.

#### 6.4.6 Caracterización reológica

Reómetro AR 1000 de la marca TA Instruments (TA Instruments, New Castle, DE) con platos paralelos de 20 mm de diámetro y un sistema Peltier para el control de la temperatura. Las muestras se ensayaron bajo deformación y frecuencia. El barrido de deformación ( $\gamma$ ) se llevó acabo de 0,1 hasta 1000 Pa y el barrido de frecuencia desde 0,1 hasta 40 Hz con un esfuerzo constante de 10 Pa. Las muestras ensayadas fueron hinchadas hasta el equilibrio (hasta obtener un peso constante en la absorción de agua).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Formación de los hidrogeles

La tabla 1 presenta los 7 tipos de hidrogeles que se sintetizaron en el presente estudio. Las diferentes proporciones permitieron la comparación de sus propiedades en función a la composición de cada hidrogel. Cabe resaltar que para todas las composiciones de hidrogeles se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de persulfato de sodio 0,2 M como iniciador de la polimerización.

En el caso de la obtención del derivado de quitosana (DCHI) haciendo uso de un agente de acoplamiento EDAC para injertar moléculas de ácido acrílico (AA) en la estructura de la quitosana. Para la caracterización del CHI y DCHI, estos fueron convertidos en películas delgadas y posteriormente fueron lavadas durante 10 minutos con una solución de metanol 99,93 % y amoníaco 25 % en relación 30:1 en v/v respectivamente. La apariencia representativa de las películas secas tanto para CHI y DCHI se muestra en la figura 17.



**Figura 17. Película delgada representativa para CHI y DCHI.**

En el caso de la obtención de los hidrogeles G1 – G7, como ya se mencionó, estos se obtienen con el uso de un molde de silicona (ver figura 16), en el cual se inyectan las soluciones preparadas según cada composición definida en la tabla 1. Una vez en los moldes, estas son puestas en un baño maría y después de 3 h los hidrogeles son desmoldados. A modo de ejemplo, se muestra el aspecto final de los hidrogeles

G1 en la figura 18. Los demás hidrogeles G2 – G7 que se han sintetizados, tuvieron el mismo aspecto físico cuando se forman después de las 3 h, sin embargo, las composiciones varían a lo largo de G1 – G7.



**Figura 18. Hidrogeles G1 formados después de 3 h de reacción.**

A partir de las tres primeras formulaciones que se mencionan en la tabla N°1, se estudió el efecto del contenido del agente entrecruzante MBAm en hidrogeles de poli(acrilamida). De esta manera se pudo comparar las propiedades finales de los hidrogeles, al variar en función el contenido del agente entrecruzante.

Los hidrogeles G4 y G5 fueron formulados de manera que permitieron estudiar el efecto del ácido acrílico y del agente de acoplamiento EDAC sobre las propiedades de dichos hidrogeles. En el caso de los hidrogeles derivados de quitosana y acrilamida G6 y G7, se comparó tanto el efecto de la polimerización por injerto de la quitosana y de la ausencia del agente de entrecruzamiento.

## 7.2 Características físicas de los hidrogeles secos

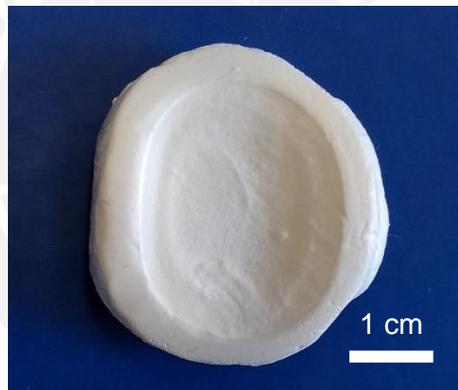
Después de que los hidrogeles son desmoldados, estos son lavados y secados en una estufa a 50 °C. La figura 19 muestran imágenes representativas de los hidrogeles producidos luego del proceso de secado en estufa para el hidrogel G1. Se aprecia que los hidrogeles secos conservan la forma inicial del molde en el cual fueron sintetizados (figura 19a.). Los promedios de los espesores y de los diámetros de los hidrogeles son de 2 mm y de 11 mm respectivamente (figura 19b.).

Una vez secos los hidrogeles, estos fueron almacenados para ser utilizados en el estudio de absorción de agua (sección 7.6).



**Figura 19. Hidrogeles G1 secados en estufa a 50 °C.**

Por otro lado, los hidrogeles también fueron liofilizados. En la figura 20, se muestra el hidrogel G4 liofilizado, y al igual que los demás hidrogeles tuvieron un aspecto parecido. Este tipo de secado permitió conservar su morfología interna y así poder caracterizar a los hidrogeles mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Estos resultados son mostrados en la sección 7.5.



**Figura 20. Muestra representativa de los hidrogeles liofilizados**

### 7.3 Mecanismo propuesto de síntesis de hidrogeles con derivados de quitosana y poli(acrilamida)

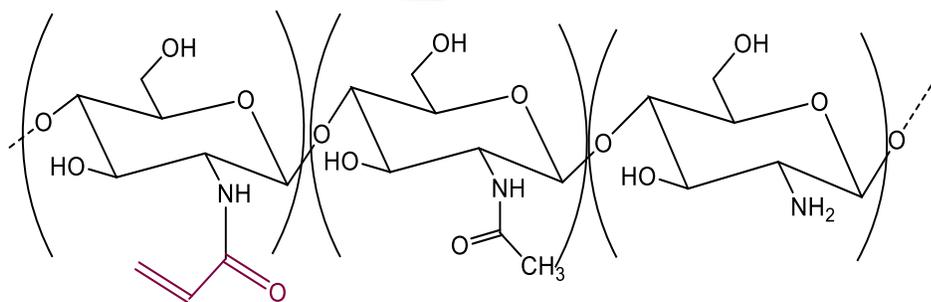
La síntesis de estos tipos de hidrogeles se llevó a cabo en dos pasos, los cuales consistieron en la obtención del derivado de quitosana (ver sección 4.5, figura 14) y la polimerización posterior en presencia de acrilamida.

En este segundo paso, se procede a la polimerización de la acrilamida en presencia del DCHI. Dicha polimerización se llevó a cabo en presencia de un agente de entrecruzamiento MBAm para el caso del hidrogel G6 y sin MBAm para G7.

El mecanismo propuesto para estos tipos de hidrogeles basados en derivados de quitosana se encuentra en la sección 4.5, figura 15. En la cual, se puede apreciar que algunas de las unidades formadas de acrilatos en la estructura de la quitosana reaccionarán formando uniones con la matriz de la poliacrilamida. Sin embargo, también habrá grupos aminos libres provenientes de la estructura de la quitosana

#### 7.4 Caracterización por IR

La estructura de la quitosana pura (CHI) y el derivado de quitosana (DCHI) mostrados en las figuras 7 y 21 respectivamente, fueron caracterizados por transmisión (FT-IR) (figura 22), lo cual permitió determinar si se llegó a dar la reacción para la formación del derivado de quitosana y ácido acrílico con el uso del EDAC como agente de acoplamiento. En la figura 22 se muestran los espectros de CHI y DCHI, en la cual se puede apreciar que para el CHI aparecen las señales características alrededor de 3430, 2868, 1586, 1075, 1150 y 902  $\text{cm}^{-1}$ . La banda ancha en 3430  $\text{cm}^{-1}$  agrupa las vibraciones de estiramiento de los grupos  $-\text{OH}$  y las vibraciones N – H intramolecular de los grupos amina de la quitosana (37,85). La región de 2910 - 2686  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a vibraciones simétricas y asimétricas de los grupos  $-\text{CH}$ ,  $-\text{CH}_2$  y  $-\text{CH}_3$ .



**Figura 21. Estructura del derivado de quitosana (DCHI).**

La banda a 1150  $\text{cm}^{-1}$  es asignada a las vibraciones de estiramiento asimétrico del enlace C–O–C (86). Las señales por debajo de los 1100  $\text{cm}^{-1}$  son atribuidas a la estructura básica de la quitosana (87), es decir, que estas señales son la huella

digital del anillo D-glicosídico y corresponden a vibraciones de estiramiento y deformación de los enlaces covalentes del anillo de glucopiranososa (85).

La quitosana usada en el presente estudio tiene como grado de desacetilación 99,85% (88), por lo que los grupos aminos deberían ser mayoritarios en comparación a los grupos N – acetilos presentes en su estructura. Esto se comprueba con el pico intenso que aparece en  $1586\text{ cm}^{-1}$  en el espectro del CHI (89). Esta señal está asociada a las vibraciones del grupo  $\text{-NH}_2$  y la intensidad, el desplazamiento o desaparición de dicha señal sería indicativo que sí se dio la reacción por injerto entre el ácido acrílico y los grupos aminos de la quitosana.

Al comparar el espectro del DCHI con el CHI se distinguen las mismas bandas características de la quitosana en ambos casos. Sin embargo, se puede apreciar el desplazamiento del pico  $1586\text{ cm}^{-1}$  del espectro de CHI a  $1581\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de DCHI, así como la disminución en la intensidad de dicho pico. Adicionalmente se puede observar la aparición de dos nuevos picos a  $1651$  y  $1720\text{ cm}^{-1}$ , los cuales están atribuidos a las vibraciones de los grupos amidas primarias  $\text{-N-C=O}$  y carboxílicos  $\text{C=O}$  (79,89) que se han generado después de la unión covalente entre el ácido acrílico y los grupos aminos de la quitosana. Por lo expuesto, se confirma a través de la espectroscopía FTIR (figura 22) que se llega a obtener el derivado de quitosana mediante el mecanismo polimerización de injerto propuesto.

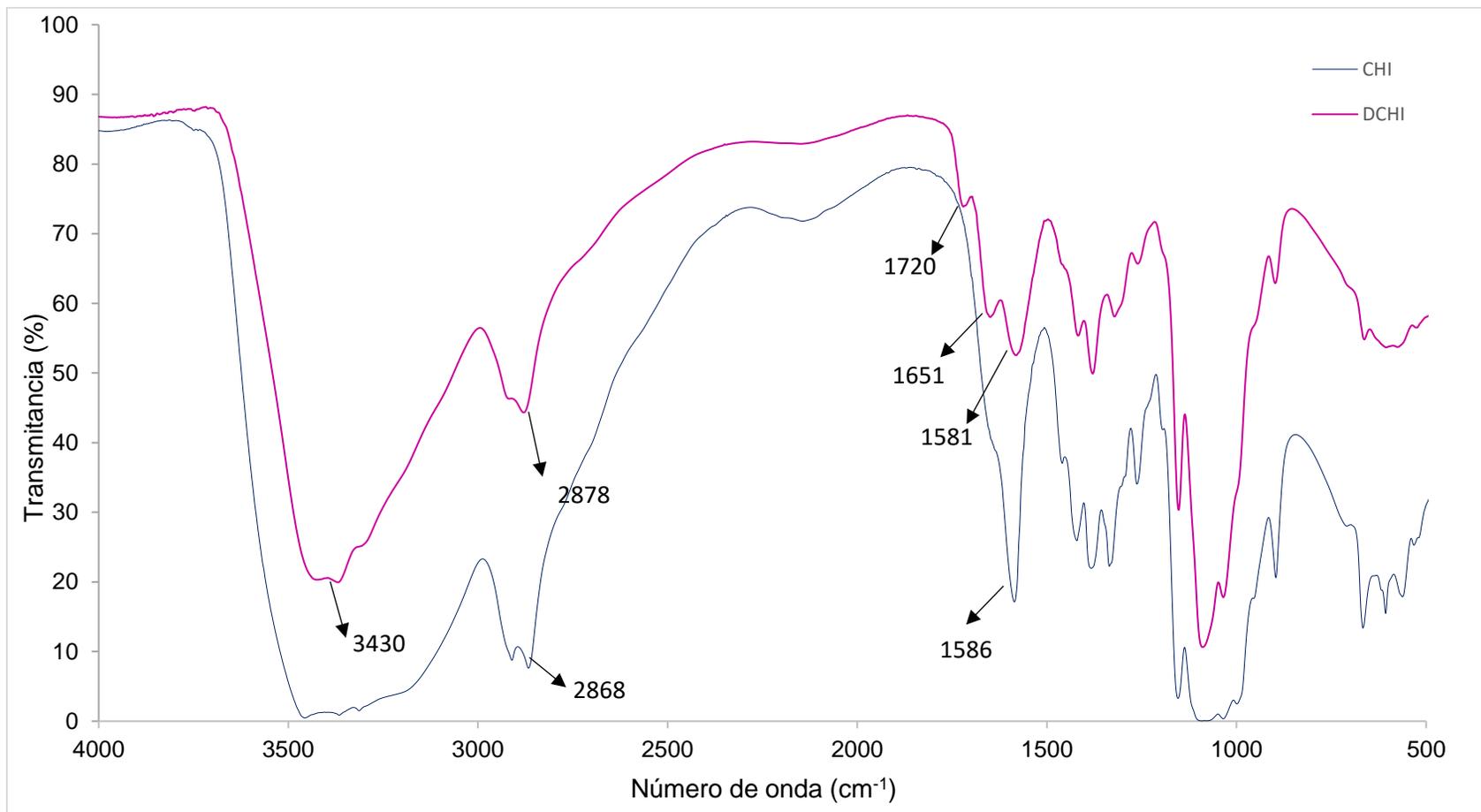


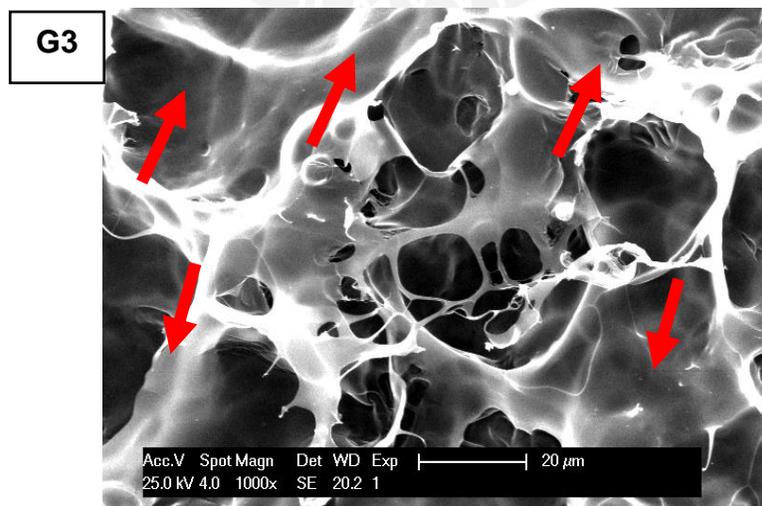
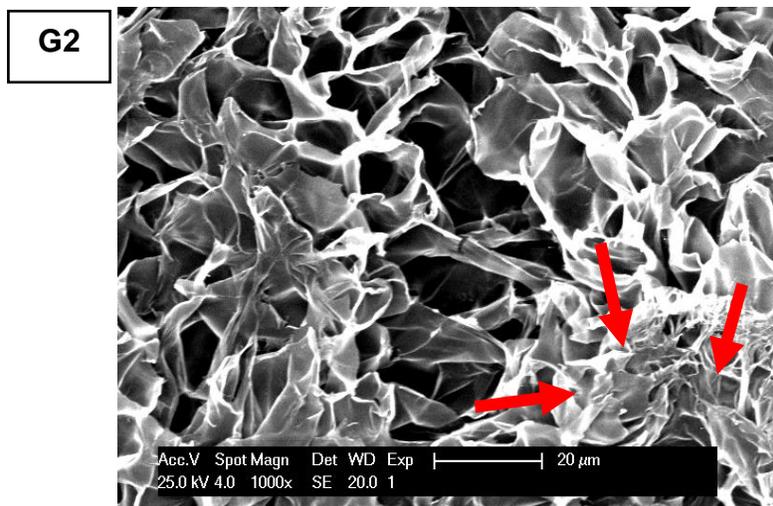
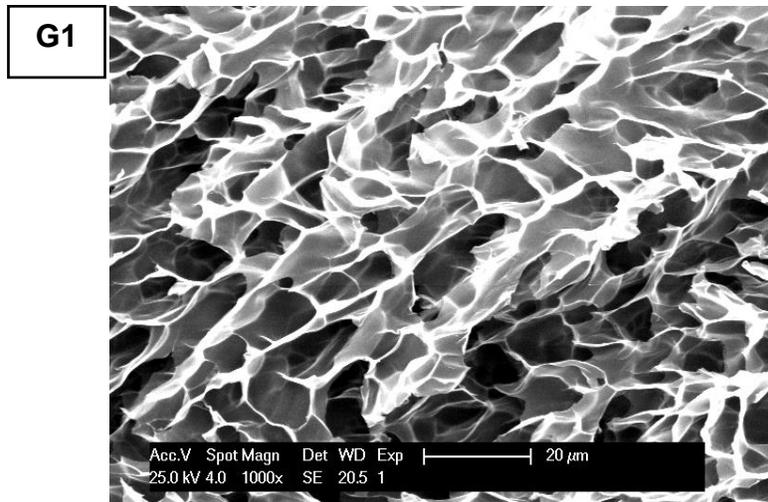
Figura 22. Espectro FT-IR de películas de quitosana (CHI) y derivado de quitosana (DCHI).

## 7.5 Análisis morfológico

La microestructura de los hidrogeles sintetizados fue estudiada mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM). Previamente, los hidrogeles fueron hinchados hasta llegar al estado de equilibrio de absorción de agua y liofilizados para la caracterización morfológica. Posteriormente se hicieron cortes transversales a los hidrogeles secos y fueron recubiertos con una aleación Au/Pd (80/20).

Las micrografías SEM representativas de los cortes transversales de G1, G2 y G3 se muestran en la figura 23 y se encuentran a 1000x aumentos. Es posible observar las diferencias estructurales que existen entre los hidrogeles de PAAm G1, G2 y G3. Estos hidrogeles difieren en el contenido del agente entrecruzante MBAm para la síntesis de hidrogeles de poliacrilamida. Aunque todos los hidrogeles presentan estructuras internas con poros interconectados, las micrografías SEM muestran que la forma y distribución de los tamaños de poro son diferentes. En el caso de los promedios de los tamaños de poro para G1, el cual según su formulación tiene el menor contenido de agente entrecruzante, se encuentra en un rango de 6,82  $\mu\text{m}$  hasta 9,81 $\mu\text{m}$ , siendo este hidrogel el que presenta mayor uniformidad en su morfología en comparación con G2 y G3. En el caso del hidrogel G2, los tamaños de los poros están en un promedio de 6,37  $\mu\text{m}$  y para el G3, el cual tiene la mayor cantidad de agente entrecruzante utilizado en su formulación, el promedio es de 5,28  $\mu\text{m}$ .

Las diferencias encontradas entre los hidrogeles G1, G2 y G3 pueden ser atribuidas a la diferencia en la densidad de entrecruzamiento en estos geles, lo cual se debe a la variación en la concentración del entrecruzante utilizado. Además, se puede observar en la figura 23 zonas colapsadas entre los poros, las cuales son indicadas con flechas rojas. Estas zonas colapsadas son partes en las cuales se encuentra contraído la morfología y es más evidente en la morfología del hidrogel G3, el cual tiene un promedio menor de 5,28  $\mu\text{m}$  para el tamaño de poro, además de tener la forma de los poros diferentes a G1 y G2.



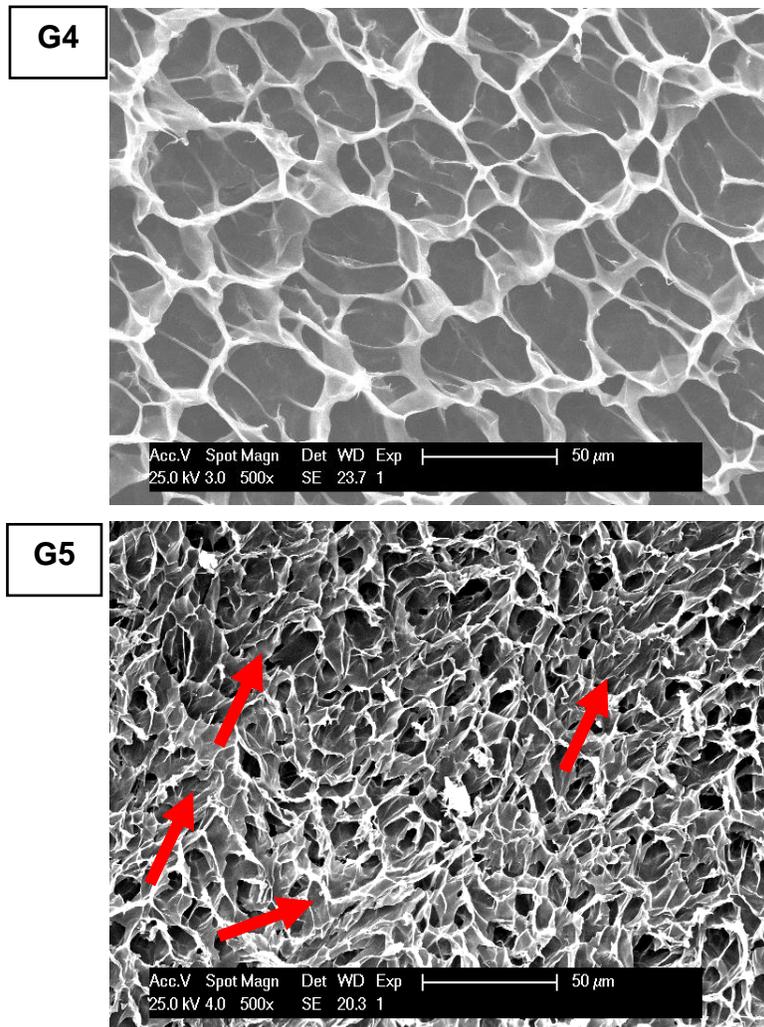
**Figura 23. Micrografía SEM de la sección transversal de los hidrogeles G1, G2 y G3. Las flechas rojas indican zonas colapsadas de poros.**

En otras investigaciones, se han reportado resultados similares al estudiar el efecto del contenido de agente entrecruzante en las propiedades fisicoquímicas de hidrogeles basados en derivados de poliacrilamida (63,71,90). La estructura interna en este tipo de sistemas depende del porcentaje del agente entrecruzante, de manera que influencia directamente en la densidad de entrecruzamiento del gel.

Por otro lado, las micrografías SEM mostradas en la figura 24 corresponden a los hidrogeles G4 y G5. Las imágenes mostradas a una magnificación de 500X muestran diferencias en la morfología interna. Estos hidrogeles sintetizados están basados en acrilamida y ácido acrílico. Como se mostró en la tabla 1, el G4 no incluye en su síntesis al agente de acoplamiento EDAC a diferencia del G5 que sí lo incluye. Aunque esta es la única diferencia en su composición, se observa grandes diferencias en la morfología.

En las micrografías mostradas se observa la influencia del uso del agente de acoplamiento EDAC en la forma y tamaño de los poros de la estructura interna del hidrogel G5. Si bien el EDAC no se queda en la estructura final de las cadenas poliméricas, este podría actuar como un conector covalente entre los grupos del ácido acrílico y la acrilamida (80,82). Es así, que el tamaño de poro promedio para el G4 es 23,6  $\mu\text{m}$ , además de tener poros más grandes con una apariencia más homogénea y regular que los observados en la micrografía de G5 con promedio de tamaño de poros de 10,5  $\mu\text{m}$ .

Por otro lado, también se puede estudiar el efecto de la presencia del ácido acrílico (AA) entre las estructuras internas de G1 y G4. Mientras que el hidrogel G1 presenta sólo en su composición poliacrilamida entrecruzada, G4 tiene en su formulación AA y AAm en una relación de 200:1. La cantidad de AA presente en la síntesis de G4 ejerce un gran cambio en el tamaño de los poros en comparación a G1. Esto se podría explicar por la repulsión electrostática que ejercen los grupos carboxilato (introducidos por el AA) pues ellos generan cargas negativas en las cadenas presentes en el hidrogel.

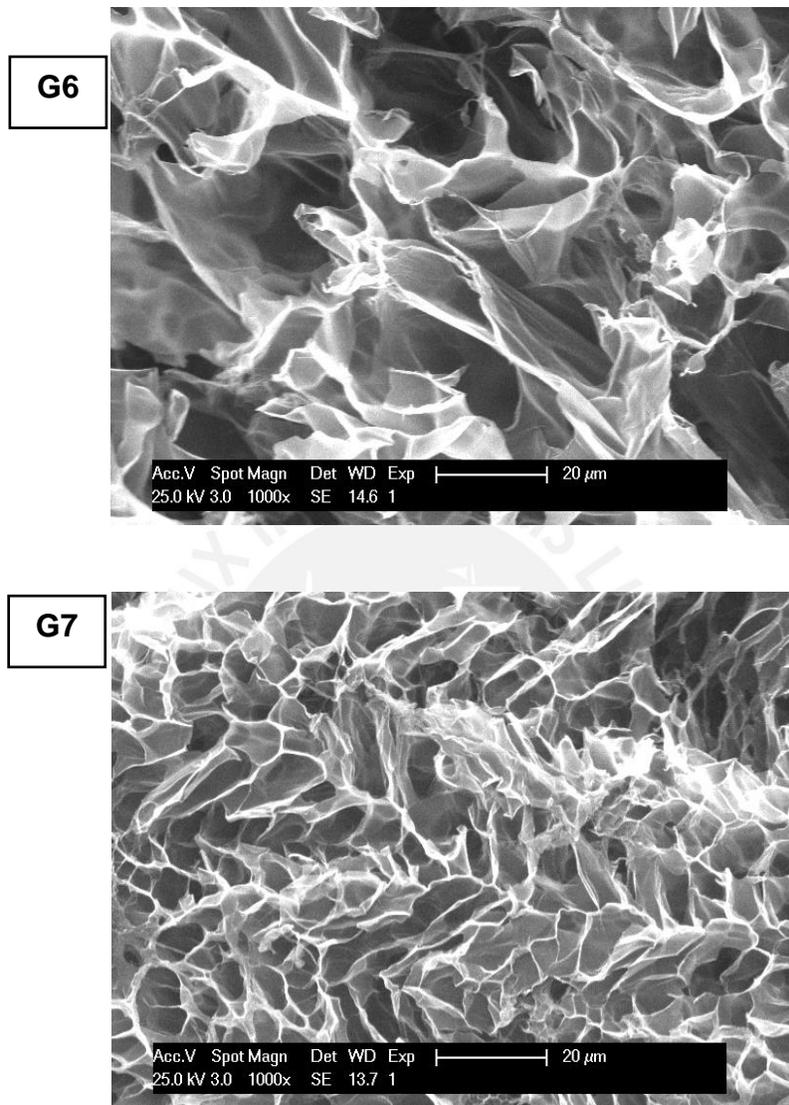


**Figura 24. Micrografía SEM de la sección transversal de los hidrogeles G4 y G5. Las flechas rojas indican zonas de poros colapsados.**

Las morfologías de los hidrogeles basados en derivados de quitosana G6 y G7 también muestran diferencias, las cuales pueden observarse en la micrografía de la figura 25. La diferencia en la composición de estos hidrogeles radica en el contenido del agente entrecruzante MBAm. Mientras que G6 hay entrecruzamientos por MBAm y por DCHI, G7 sólo por DCHI.

La diferencia en las composiciones de G6 y G7 genera variaciones en las formas y tamaños de los poros. El promedio de poro para G6 y G7 es de 8,1 µm y 9,5 µm

respectivamente. Asimismo, la forma de los poros de G6 es más heterogénea que las mostradas en G7.



**Figura 25. Micrografía SEM de la sección transversal de los hidrogeles G6 y G7.**

Por otro lado, se puede hacer una comparación entre los hidrogeles G5 y G6 los cuales, según la formulación descrita en la tabla 1, difieren en el contenido de derivado de quitosana (DCHI) utilizado. Mientras que G5 no está formulada con DCHI, G6 sí contiene DCHI y se puede observar las diferencias que genera el contenido de DCHI en los tamaños de poros de estos hidrogeles en las figuras 24 y

25, tanto como en el tamaño de poro como en la forma de estos. Siendo el tamaño de poro G5 mayor al de G6.

En todas las micrografías mostradas en las figuras 23-25 se pudo observar estructuras con poros interconectados que se encuentra presentes en todos los hidrogeles sintetizados. Los promedios del tamaño de poros para los hidrogeles sintetizados se presentan en la tabla 2 en función de las distintas composiciones de los hidrogeles sintetizados.

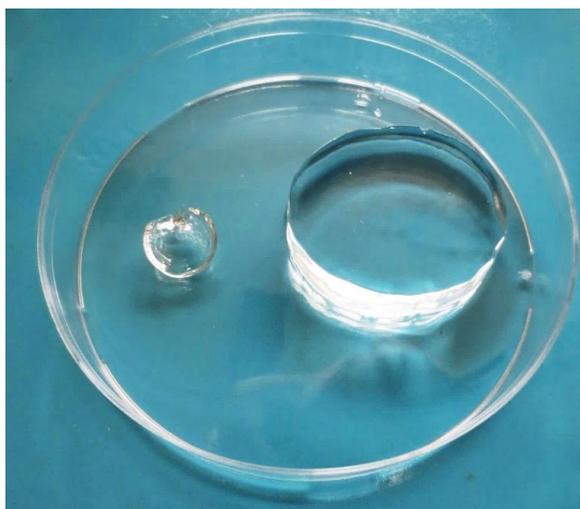
**Tabla 2. Tamaño promedio de poros de los hidrogeles obtenidos por micrografía SEM.**

Hidrogel	Tamaño de poro ( $\mu\text{m}$ )
G1	$6,82 \pm 1,23$
G2	$6,37 \pm 1,07$
G3	$5,28 \pm 1,89$
G4	$23,6 \pm 2,23$
G5	$10,5 \pm 1,74$
G6	$8,1 \pm 1,67$
G7	$9,5 \pm 0,44$

La formulación para cada tipo de hidrogel influye no solo en sus características morfológicas, sino también en las propiedades finales de dichos materiales, los cuales se detallan en las siguientes secciones.

## 7.6 Grado de hinchamiento o absorción de agua ( $H_{H_2O \text{ absorbido}}$ )

Una de las propiedades resaltantes de los hidrogeles es su capacidad para hincharse cuando entran en contacto con agua. La figura 26, muestra la comparación representativa del hidrogel seco en estufa a 50 °C y luego de ser hinchado en agua hasta el equilibrio. El valor de  $H_{H_2O \text{ absorbido}}$  y las dimensiones finales que adquirieron los hidrogeles dependieron de la composición estructural de cada muestra.

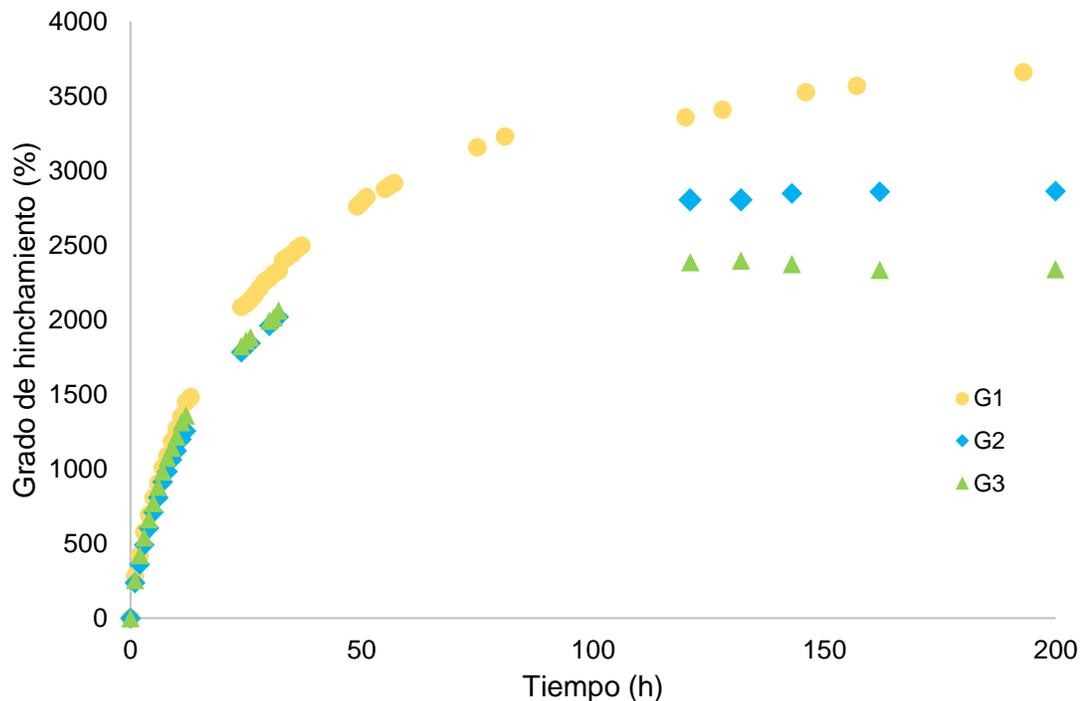


**Figura 26. Comparación del hidrogel G6 seco e hinchado en agua.**

Se investigó la dependencia del grado de absorción de agua ( $H_{H_2O \text{ absorbido}}$ ) de los hidrogeles sintetizados G1 – G7 y también su dependencia en el tiempo. Se realizó una réplica de 3 muestras por hidrogel y calculó el promedio para el valor de H.

La figura 27 muestra la evolución del grado de absorción de los hidrogeles G1, G2 y G3. Estos hidrogeles fueron sintetizados variando las cantidades de entrecruzador. Debajo de las 50 horas, se puede observar que la pendiente del grado de absorción de los hidrogeles G1, G2 y G3 son similares. Posteriormente, se puede observar la influencia de la concentración del MBAm en la capacidad de absorción de agua. Mientras aumenta el contenido de entrecruzante utilizado, el valor de  $H_{H_2O \text{ absorbido}}$  en el estado de equilibrio o en el punto de máxima absorción de agua, disminuye. Esto se puede explicar debido a la cantidad de puntos de entrecruzamiento en la red polimérica. Al tener mayor concentración de

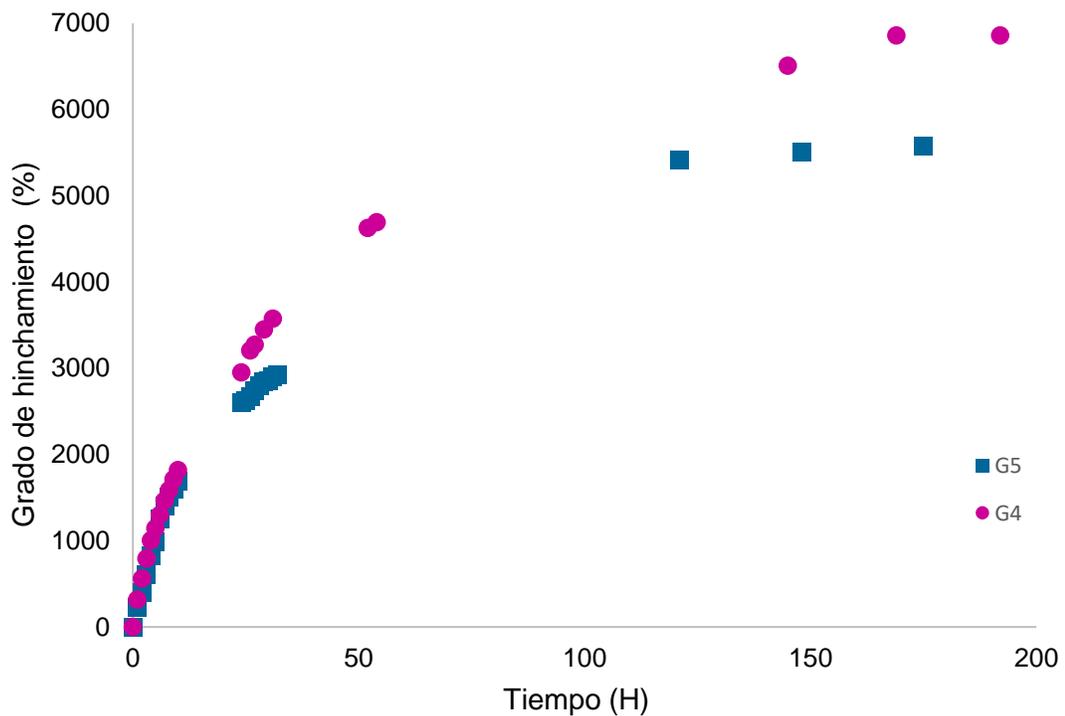
entrecruzador, aumenta la densidad de entrecruzamiento (que es el número de puntos de entrecruzamiento por unidad de volumen), lo que genera que la red polimérica esté más interconectada y que el valor del grado de hinchamiento de agua en el equilibrio sea menor  $H_{G3} = 2400 \%$  en comparación con los valores de  $H_{G2} = 2800 \%$  y  $H_{G1} = 3600 \%$ . Estos resultados tienen concordancia con los datos obtenidos a partir de las micrografías SEM presentadas en la anterior sección. De las micrografías presentadas se sabe que los valores de tamaño de poro disminuyen cuando aumenta la cantidad de agente entrecruzante utilizado en la síntesis.



**Figura 27. Grado de hinchamiento de los hidrogel G1, G2 y G3.**

Por otro lado, en el caso de los hidrogel G4 y G5 (figura 28) los valores de H en el estado de equilibrio son  $H_{G4} = 6800$  y  $H_{G5} = 5500$  respectivamente. Estos hidrogel son los que tienen los valores de  $H_{H_2O\ absorbido}$  más altos en comparación a los demás que se han sintetizado en el presente estudio. Esta característica puede ser relacionada con la capacidad de hinchamiento de un hidrogel que contiene ácido acrílico y acrilamida. Es posible que ocurra una sinergia entre los grupos que contiene un hidrogel sintetizado a partir de estos monómeros da como resultado

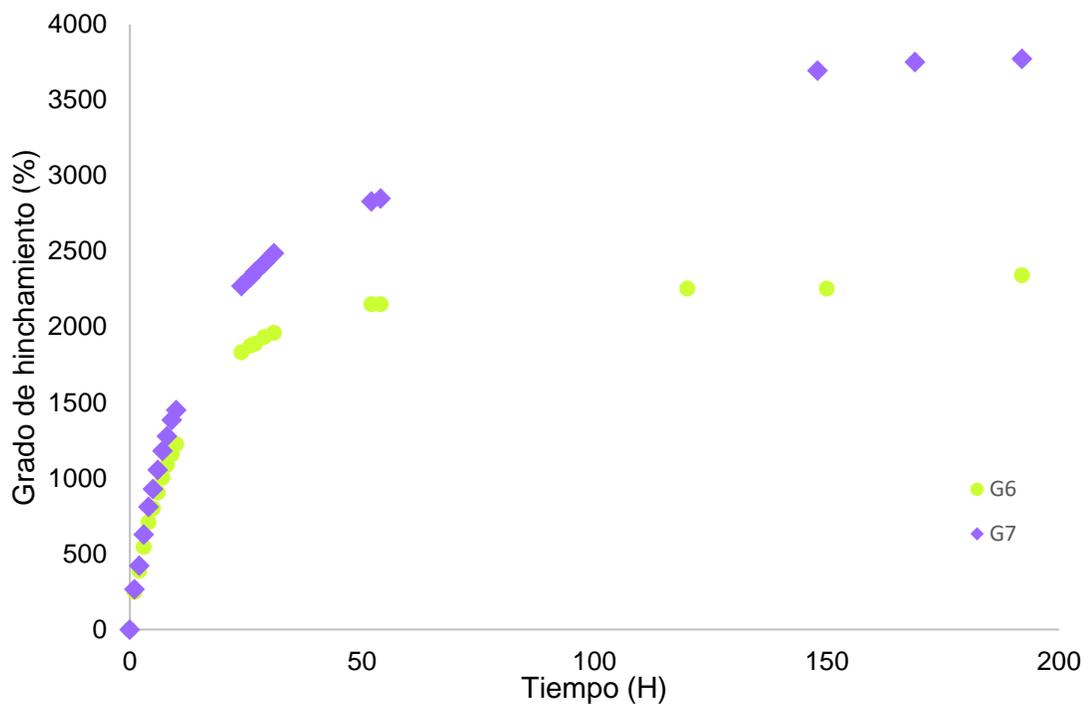
valores más altos para la capacidad de hinchamiento en agua de dichos hidrogeles. Sin embargo, a pesar que tienen valores altos de  $H_{H_2O\text{ absorbido}}$ , entre G4 y G5 existe diferencia en este valor. Esto es debió a que el G5 fue sintetizado con el agente de conjugación EDAC, el cual indujo a la formación de nuevos enlaces entre los grupos funcionales de la acrilamida y el ácido acrílico. A diferencia que, en el G4, contiene sólo al agente entrecruzante MBAm, el cual va a generar puntos de entrecruzamiento entre moléculas iguales de AAm o AA y entre ellas.



**Figura 28. Grado de hinchamiento de los hidrogeles G4 y G5.**

Por último, los valores de  $H_{H_2O\text{ absorbido}}$  de la figura 29 muestran las mediciones para los hidrogeles derivados de quitosana. Los valores de H para los hidrogeles G6 y G7 fueron  $H_{G6}=2300$  y  $H_{G7}= 3700$  respectivamente. En la composición del G6 se encuentra el agente de entrecruzamiento MBA y el DCHI, los cuales inducirían más puntos de entrecruzamiento en la estructura del hidrogel a diferencia que en el G7, el cual se ha formado sólo hay puntos de entrecruzamiento entre el derivado de

quitosana y la matriz de poliacrilamida, por lo que este material podría contener menos puntos de entrecruzamiento.



**Figura 29. Grado de hinchamiento de los hidrogeles G6 y G7.**

La Tabla 3 resume los valores calculados para  $H_{H_2O\ absorbido}$  en el equilibrio y el contenido de agua en el equilibrio de los hidrogeles G1 – G7.

**Tabla 3 Capacidad de hinchamiento de hidrogeles**

Hidrogel	$H_{H_2O \text{ absorbido}} \%$
G1	3600
G2	2800
G3	2400
G4	6800
G5	5500
G6	2300
G7	3700

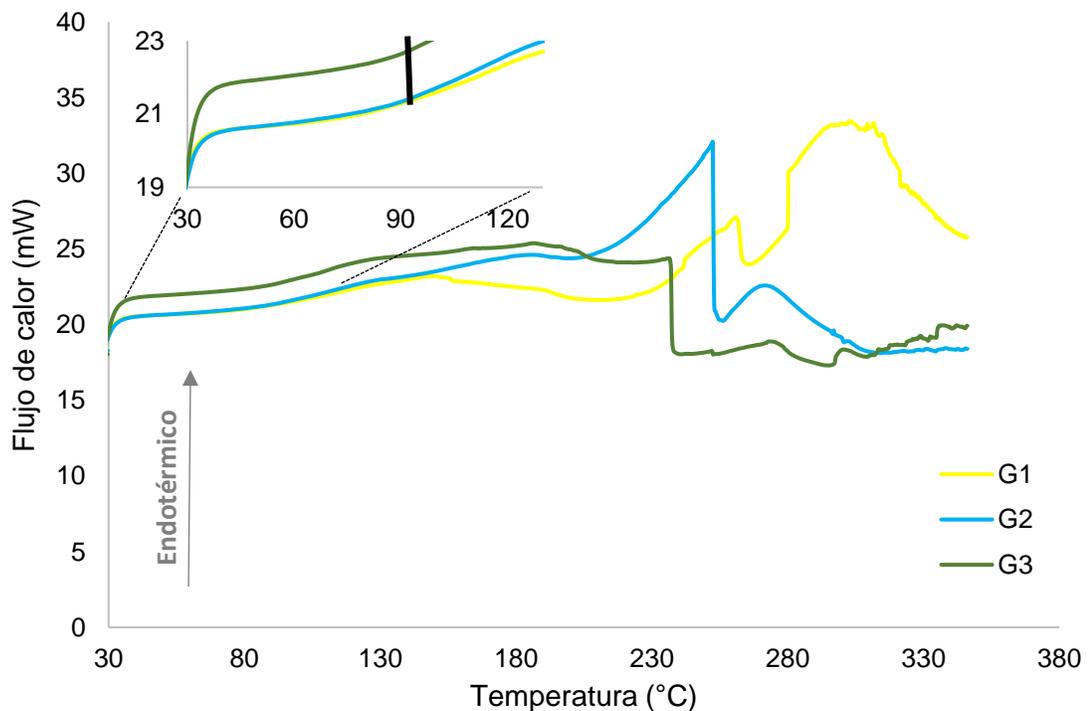
### 7.7 Análisis térmico

El estudio de las transiciones térmicas y la influencia de la composición sobre la estabilidad térmica de los hidrogeles fue analizado mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se debe tener especial cuidado con este tipo de materiales que pueden absorben agua, ya que podrían generar erróneos resultados en los termogramas por efecto de la humedad (91). Para ello se realizan dos ciclos de calentamiento y uno de enfriamiento, teniendo en consideración que el primer ciclo de calentamiento sea por muy debajo de la temperatura de descomposición del material ensayado. De esta manera en el primer calentamiento se elimina cualquier contenido de humedad en la muestra ensayada.

Los termogramas representativos obtenidos por DSC de los hidrogeles G1-G7 se muestran en las figuras 30 – 32, los cuales son los correspondientes al segundo ciclo de calentamiento a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. En el caso

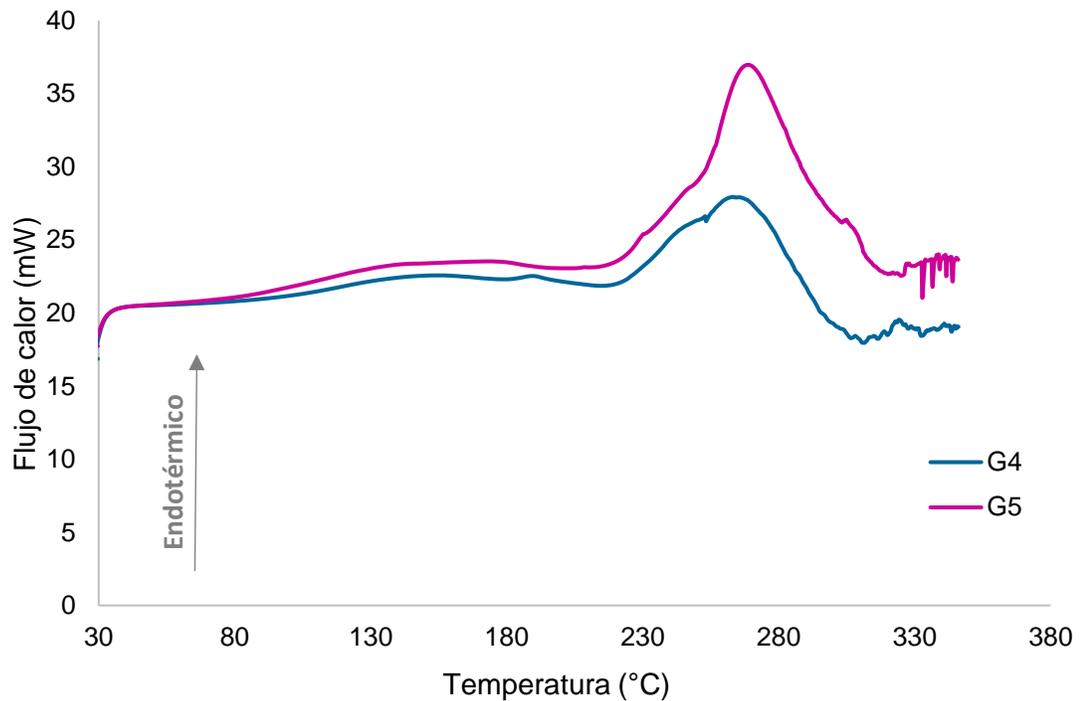
de las figuras 30 – 32, se indica el proceso endotérmico con la flecha correspondiente hacia valores que van aumentando en el eje Y. Esta dirección nos indica que todos los picos que aparecen hacia arriba son procesos endotérmicos en los cuales la muestra absorbe calor. Por el contrario, si durante el barrido de temperatura aparece un pico con orientación hacia abajo, estos corresponderían a procesos exotérmicos.

En la figura 30 se muestra las propiedades térmicas de los hidrogeles G1, G2 y G3. Se puede detectar la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de la poliacrilamida alrededor de 97 °C para este tipo de hidrogeles, lo cual también está acorde con lo reportado por otros autores (92,93). A pesar que este tipo de transición es afectado por la densidad de entrecruzamiento, no se llega a distinguir diferencias en el valor de  $T_g$  de los hidrogeles G1, G2 y G3. Por otro lado, a partir de los 200° C se observa la aparición de 2 picos endotérmicos. La primera temperatura se puede atribuir al proceso de fusión del polímero (62,94,95) y la pérdida de amoníaco de las cadenas de poliacrilamida. El segundo pico a partir de los 260 °C se relaciona con la descomposición del material.



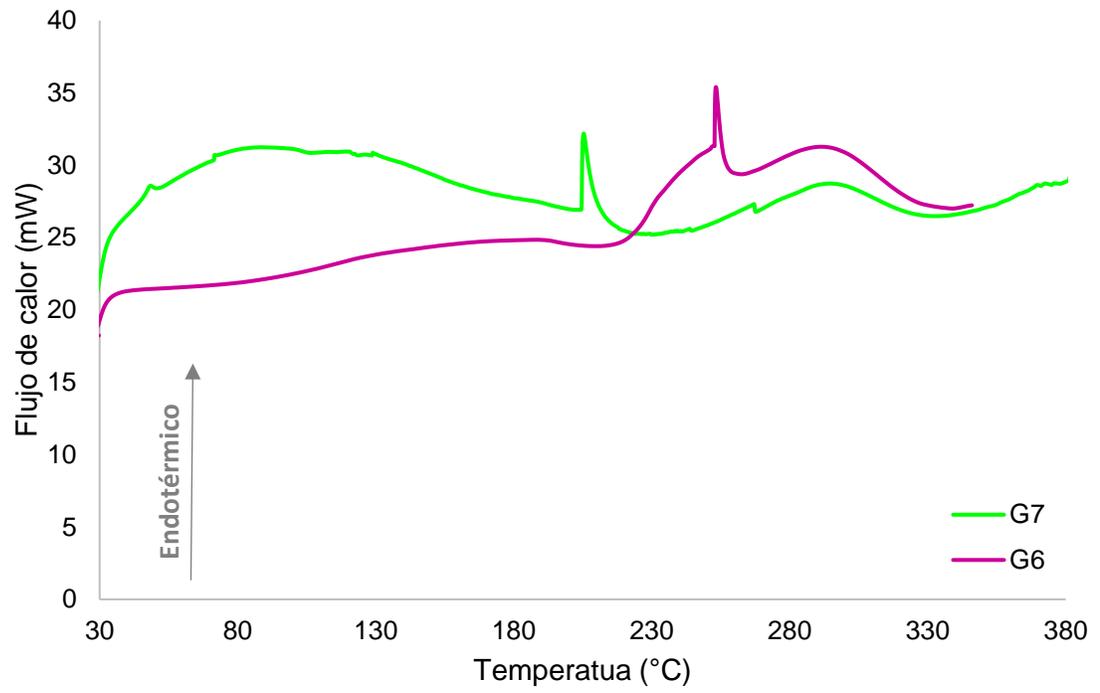
**Figura 30. Termograma de los hidrogeles G1, G2 y G3**

En el caso de los hidrogeles G4 y G5 que, además de poliacrilamida contienen ácido acrílico en su composición, se observa que el perfil de los termogramas representativos (figura 31). varía respecto a los de G1, G2 y G3. Se puede notar que aún aparece el  $T_g$  correspondiente a la poliacrilamida, pero se detecta que esta aparece a temperaturas cercanas a 90°C. Esta disminución podría estar atribuida a que los hidrogeles de poliacrilamida y ácido acrílico forman cadenas más flexibles, por lo que no necesitan tanta energía para su movimiento. Otra diferencia es que solo aparece un solo pico endotérmico alrededor de 280°C, el cual se atribuye a la descomposición de este tipo de hidrogeles.

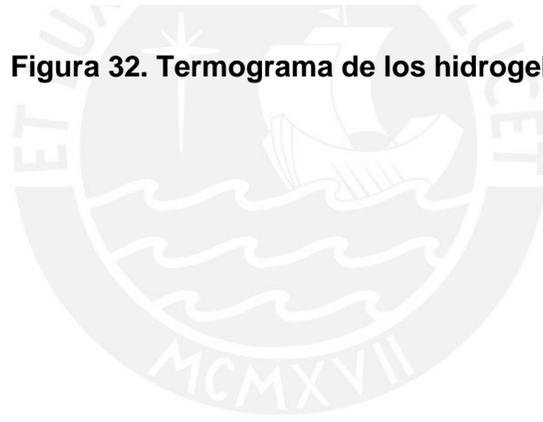


**Figura 31. Termograma de los hidrogeles G4 y G5**

Por último, los termogramas representativos de la figura 32 corresponden a los hidrogeles con derivado de quitosana G6 y G7. Se puede observar un pico endotérmico alrededor de 250°C para G6 que se podría atribuir a la temperatura de fusión del hidrogel, mientras que a partir de 270 °C aparece un pico exotérmico que está relacionado con la temperatura de descomposición de la quitosana (65).



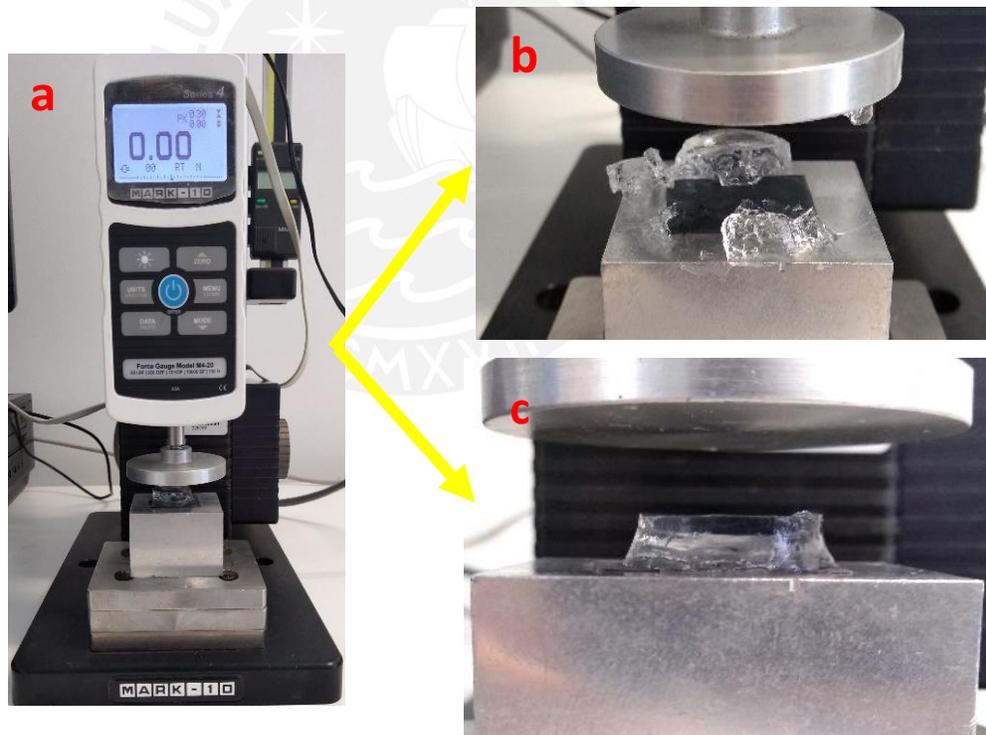
**Figura 32. Termograma de los hidrogeles G6 y G7**



## 7.8 Caracterización mecánica

Los ensayos de compresión permiten conocer propiedades mecánicas de los hidrogeles como el módulo elástico por compresión y la deformación ( $\epsilon$ ) que sufre el material al someterse a una fuerza variable.

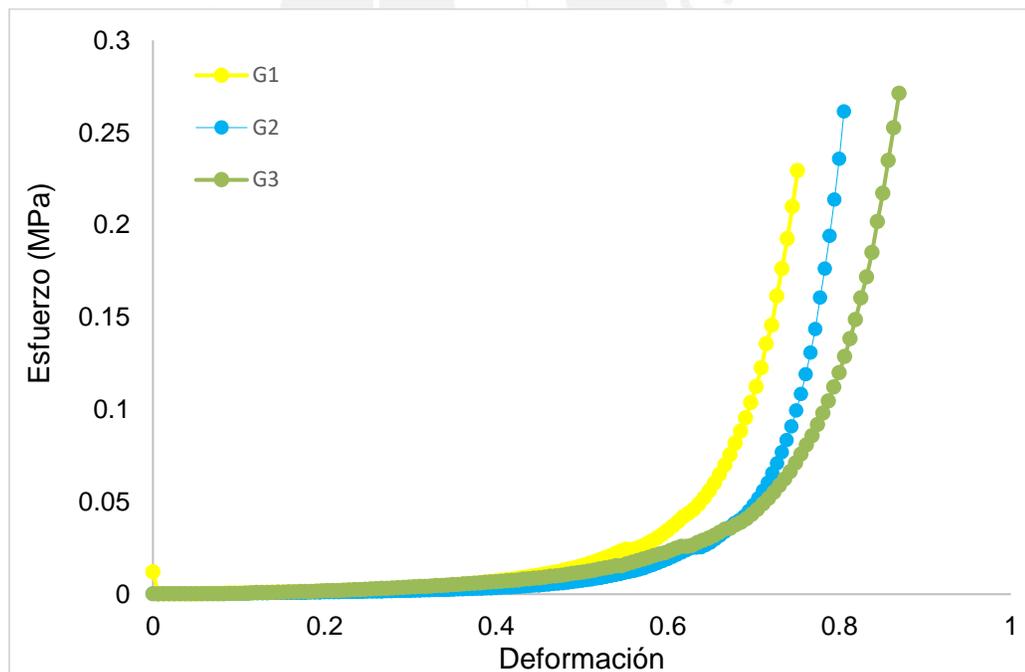
Para realizar el ensayo de compresión se cortaron los hidrogeles con un troquel cilíndrico, de manera que se pudo conocer el área transversal de las muestras a partir de las dimensiones medidas de espesor y altura. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en el medio de dos superficies metálicas (ver figura 33a). Dos situaciones ocurrieron con las muestras ensayadas. La primera es donde ocurre la fractura del material al no soportar la carga a la cual está sometida (figura 33b); y la segunda situación es la preservación de su integridad cuando se retira la carga (figura 33c).



**Figura 33. Ensayo de compresión mecánica que representa el montaje del hidrogel entre mordazas (a), hidrogel fracturado (b) e hidrogel elástico (c).**

Los hidrogeles sintetizados G1 - G7 fueron sometidos a ensayos de compresión, en un estado de hinchamiento en el estado de equilibrio, es decir, en su máxima capacidad de hinchamiento de agua. Las figuras 34 – 36 muestran las curvas representativas (de un promedio de 3 pruebas) de los resultados de esfuerzo vs deformación de los ensayos de compresión.

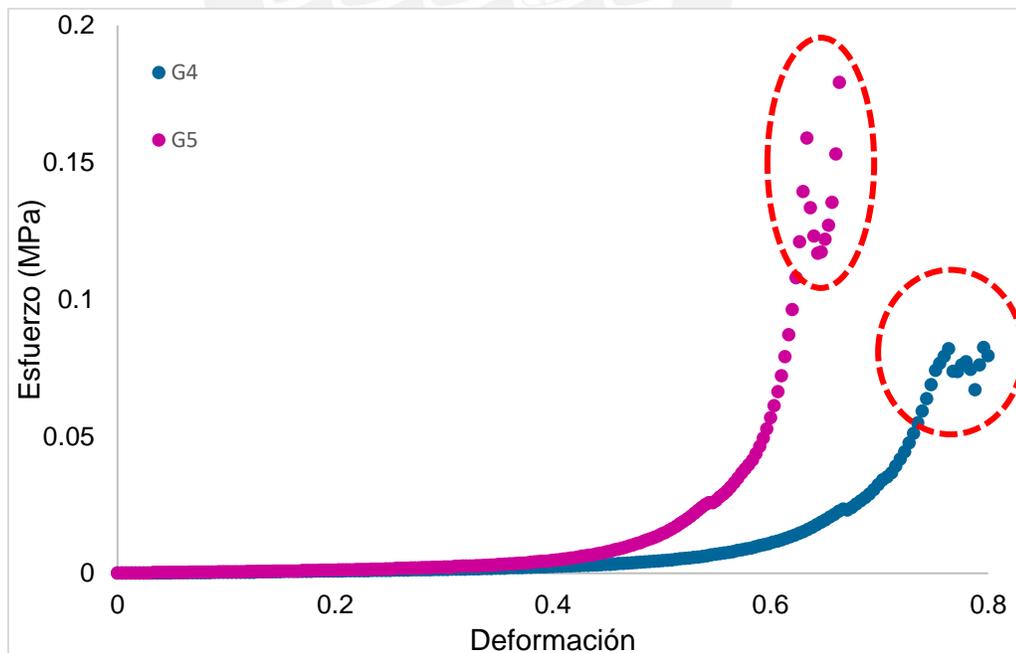
En la figura 34 se puede observar el efecto del contenido del agente entrecruzante en los hidrogeles G1, G2 y G3. Estos hidrogeles se formularon con diferentes cantidades de agente entrecruzante MBAm como se detalla en la tabla 1. Los valores de módulo elástico por compresión se calcularon de las pendientes de las curvas en un rango de deformaciones de 0,4 – 0,6. Los valores de módulo elástico para G1, G2 y G3 son 0,135, 0,132 y 0,1574 MPa y de deformación unitaria ( $\epsilon$ ) de 75, 80 y 87 %, respectivamente. Los valores del módulo elástico aumentan con el contenido de MBAm en las estructuras de los hidrogeles. Este comportamiento también ha sido reportado (96,97)



**Figura 34. Curvas de deformación vs esfuerzo en ensayos de compresión de los hidrogeles G1, G2 y G3**

De la misma manera, se muestra la curva esfuerzo-deformación para los hidrogeles de poliacrilamida que incorporan ácido acrílico G4 y G5 (figura 35). Se puede observar que G5 presenta una mayor resistencia a la compresión que G4, siendo los valores del módulo elástico 0,068 y 0,122 MPa y de  $\epsilon$  60 y 80 %, respectivamente.

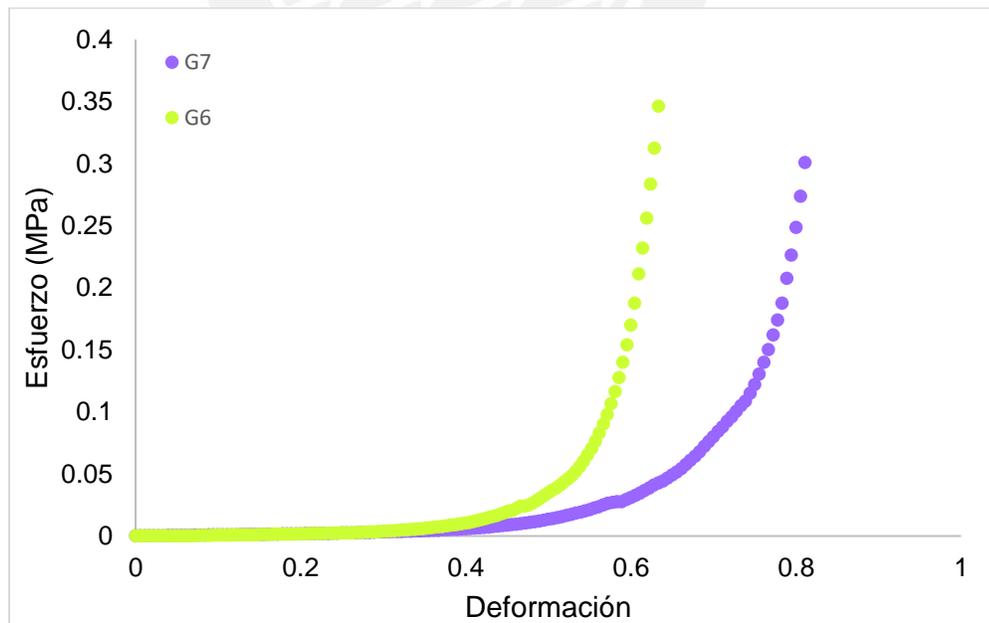
Se sabe que la capacidad de hinchamiento para el hidrogel G4 es mayor que la de G5 ( $H_{G4} = 6800\% > H_{G5} = 5500\%$ ), lo cual también está relacionado con los tamaños de poros que presenta en su estructura interna. Estos resultados reportados en secciones previas están relacionados a la resistencia a la compresión de los hidrogeles G4 y G5. Es decir, que G4 y G5 al tener tamaños de poros más grandes en comparación con los demás hidrogeles, tienen más agua, lo que genera que su estructura interna sea más blanda por mayor contenido de agua que tiene. Esto se ve reflejado en el bajo valor del módulo elástico (figura 35) y que durante el ensayo se formaron grietas que hicieron variar al valor de la resistencia a la compresión cómo se indica con puntos dentro de los círculos rojos (figura 35) y que al final del ensayo el hidrogel sufra una la fractura (figura 33b) y pérdida de sus propiedades iniciales para ambos hidrogeles G4 y G5.



**Figura 35. Curvas de deformación vs esfuerzo en ensayos de compresión de los hidrogeles G4 y G5**

En el caso de los hidrogeles derivados de quitosana G6 y G7, se puede observar en la figura 36 un comportamiento similar a los hidrogeles G1, G2 y G3. Los hidrogeles G6 y G7 tuvieron un módulo elástico de 0,23 y 0,17 MPa y de  $\epsilon$  de 60 y 82 % para G6 y G7, respectivamente.

Como se puede observar, al comparar los valores del módulo elástico entre G6 y G7, resulta que G6 tiene el valor más alto, es decir, que es el hidrogel que tiene mayor rigidez. Lo que significa que la estructura interna de G6 basada en el derivado de quitosana en una matriz de poliacrilamida en presencia de una gente entrecruzante forman una red que permite disipar la energía y resistir valores más altos en comparación también con los calculados para los demás hidrogeles, además de poder conservar su estructura sin llegar a la fractura. En cambio, los hidrogeles G4 y G5 se fracturaron bajo compresión posiblemente por tener AA sin ser injertado en CHI, pero G6 y G7 no, a pesar que también tienen AA pero sí estaban injertados en las cadenas de la CHI. Esto se podría atribuir a que el EDAC elimina la posibilidad de que el AA forme cargas negativas y reduce la repulsión de estos grupos. Mientras que en G7 y G6, estas cargas se vuelven puntos de entrecruzamiento con la quitosana.



**Figura 36. Curvas de deformación vs esfuerzo en ensayos de compresión de los hidrogeles G6 y G7**

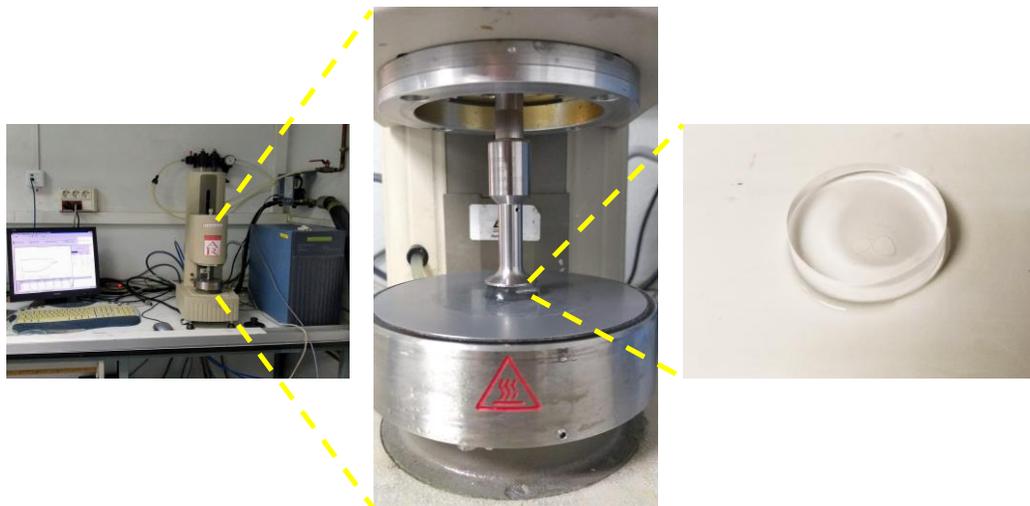
En la tabla 4 se muestran los valores de módulo elástico obtenidos por compresión para los hidrogeles G1 – G7 sintetizados. De los cuales, G4 y G5 son los únicos geles que se fracturaron durante el ensayo de compresión.

**Tabla 4. Propiedades mecánicas de los hidrogeles G1 – G7 obtenidos por ensayo de compresión.**

Hidrogel	$E$ (MPa)	$\varepsilon$ (%)
G1	0,135	75
G2	0,132	80
G3	0,157	87
G4	0,068	60
G5	0,122	80
G6	0,23	60
G7	0,17	82

### 7.9 Caracterización reológica

Para el estudio reológico de los hidrogeles sintetizados, estos fueron hinchados hasta llegar a su estado de equilibrio. Las muestras ensayadas tuvieron una forma cilíndrica de 20 mm de diámetro y un espesor entre 10 y 50 mm. La figura 37 muestra el montaje de los hidrogeles en el equipo reómetro, en el cual se realizaron dos tipos de ensayos oscilatorios para estudiar las propiedades reológicas de los hidrogeles: barridos de torque ( $M$ ) o deformación ( $\gamma$ ) y barridos de frecuencia angular.



**Figura 37. Ensayo de reología de hidrogeles**

Las figuras 38 – 40 muestran los resultados de los módulos elástico ( $G'$ ) y de viscosidad ( $G''$ ) de los hidrogeles G1 – G7 en función a la deformación aplicada, a una frecuencia de 1 Hz a 25 °C. Este primer ensayo es importante para la caracterización reológica de los hidrogeles, ya que permite conocer el rango de viscoelasticidad lineal (LVR), la deformación crítica de ( $\gamma_c$ ) y, posteriormente, usar estos datos para los ensayos oscilatorios de frecuencia.

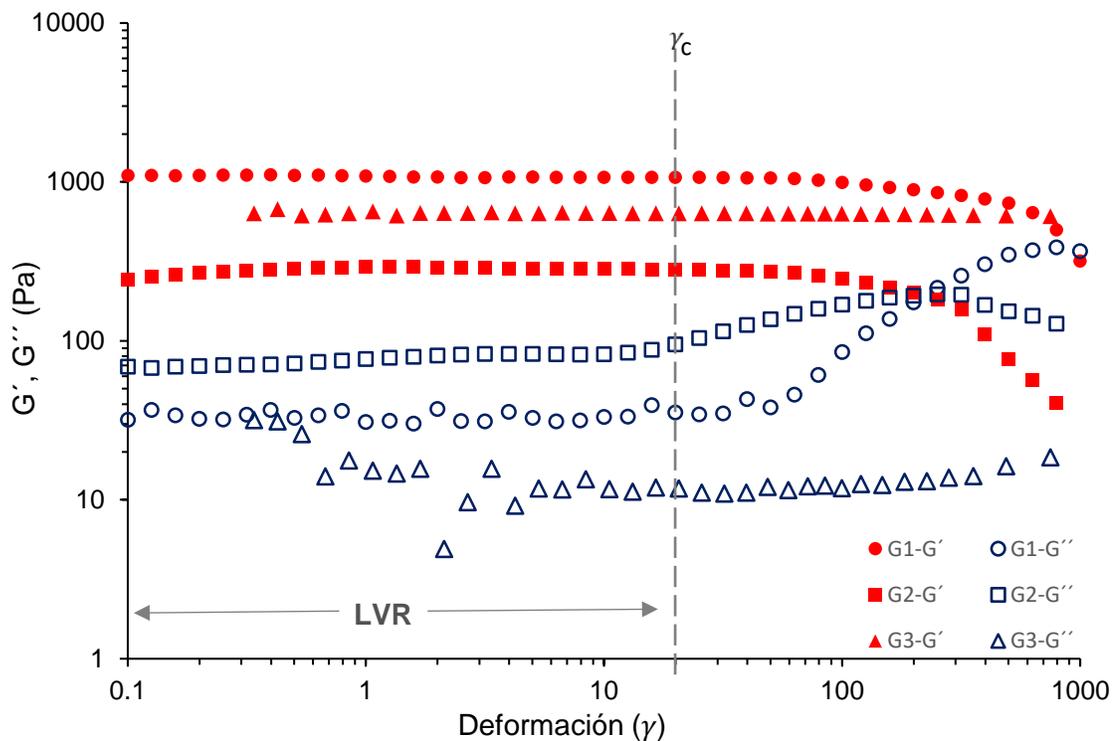
Por otro lado para todas las muestras se cumple las tres características primordiales que definen a un hidrogel desde el punto de la reología (29):

- El módulo elástico  $G'$  es superior al módulo viscoso  $G''$ .
- Presentar un valor de  $G'$  finito a frecuencias bajas.
- El módulo  $G'$  presenta una región lineal en un rango de frecuencias aplicadas.

Se observa en la figura 38 las diferentes respuestas de los módulos  $G'$  y  $G''$  de los hidrogeles G1, G2 y G3, donde predominante el comportamiento elástico ( $G' > G''$ ) en todos los casos. Además, se puede identificar el rango de viscoelasticidad lineal (LVR) en la gráfica para los estos tipos de hidrogeles. Para esto, se determina

visualmente el punto del módulo elástico previo a su caída en función a la deformación de cizalla aplicada.

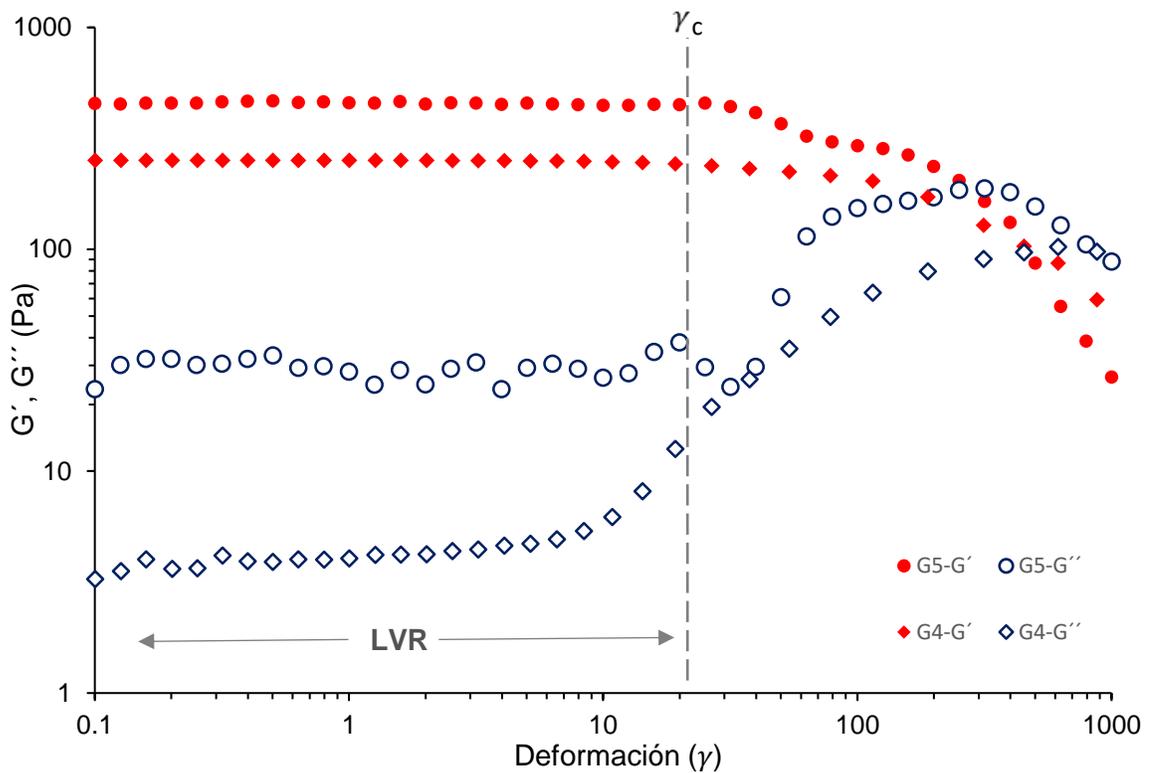
Los hidrogeles G1, G2 y G3 difieren en el contenido del agente entrecruzante MBAm, lo que genera una diferencia en la densidad de entrecruzamiento a nivel estructural. Los resultados muestran que esta diferencia influye en los valores de  $G'$  y en los valores de la deformación crítica por cizalla ( $\gamma_c$ ), la cual se determina al como el valor de deformación máxima a la cual el valor de  $G'$  permanece constante en la LVR. Para G1, G2 y G3 los valores de  $\gamma_c$  son 25, 32 y 39 % respectivamente. La identificación de la LVR en las muestras ensayadas está relacionada con la forma estable y estructurada que poseen estos hidrogeles. Además, durante todo este rango de deformaciones, el módulo  $G'$  no exhibe cambios, es así que, cuando se realizan los ensayos oscilatorios de deformación por debajo de los valores de  $\gamma_c$ , la estructura de los hidrogeles se mantiene intacta y la respuesta del material tiene un comportamiento de una estructura sólida ya que predomina el módulo  $G'$  sobre el  $G''$ .



**Figura 38. Evolución de  $G'$  y  $G''$  en función al barrido de deformación aplicado para los hidrogeles G1, G2 y G3.**

En caso se hubiera observado una ausencia del LVR, esto sería indicativo de un proceso incompleto de puntos de entrecruzamiento en los hidrogeles por lo que generaría una estructura inestable (98).

Para el caso de los hidrogeles G4 y G5, se muestra los resultados de los ensayos de barridos de deformación en la figura 39. De manera similar, la respuesta elástica de estos materiales predomina ( $G' > G''$ ), así como la LVR también está presente en un intervalo de deformación aplicado y tienen como valores de  $\gamma_c$  32 y 37 % para G4 y G5, respectivamente. Esto indica que los hidrogeles basados en acrilamida y ácido acrílico también tienen una estructura estable en un rango de deformaciones por cizalla. Los valores de los módulos  $G'$ ,  $G''$  empiezan a decaer o ascender a partir del límite establecido por  $\gamma_c$ , ya que la estructura del material ya no es estable para estos valores de deformación por cizalla.

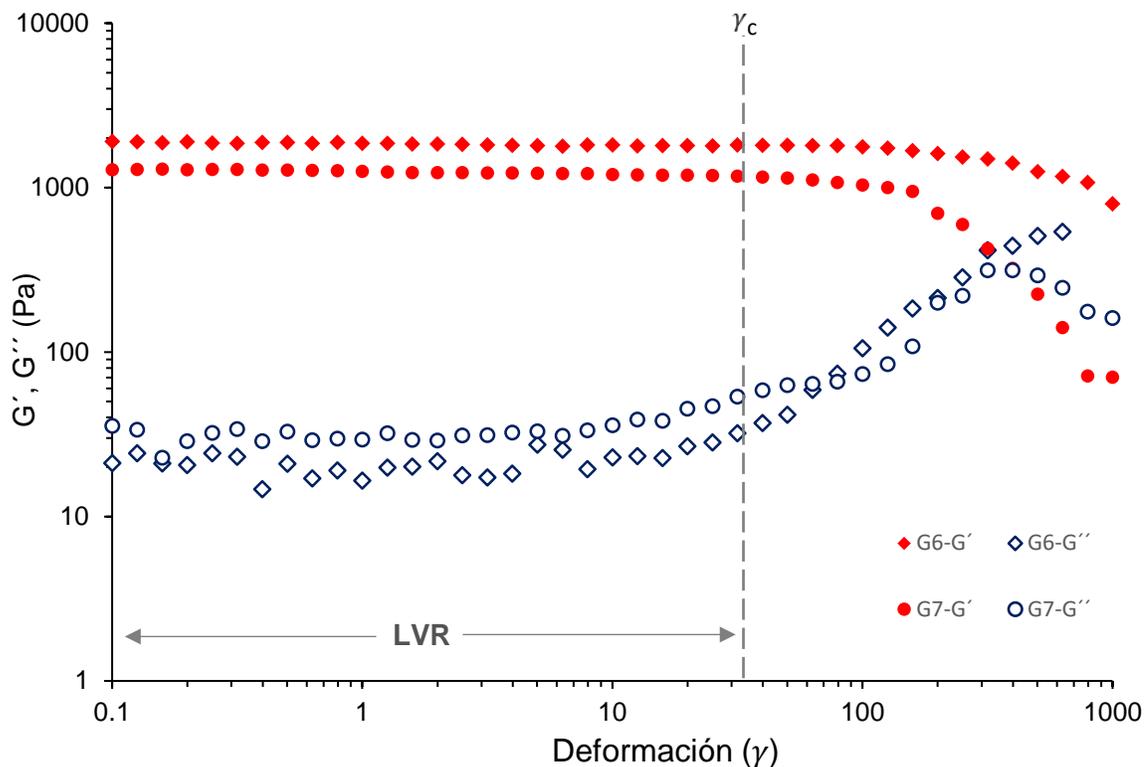


**Figura 39. Evolución de  $G'$  y  $G''$  en función al barrido de deformación aplicado para los hidrogeles G4 y G5.**

Por otro lado, la figura 40 muestra el comportamiento de los hidrogeles G6 y G7 en función del barrido de deformación. Como se ha estado analizando, la amplitud del LVR en las gráficas obtenidas y los valores de  $G'$  que se encuentran dentro de la LVR pueden ser usados como un indicativo de la estabilidad estructural de los hidrogeles sintetizados.

Así como en los resultados de los hidrogeles G1 – G5, se observa en la figura 42 que los hidrogeles G6 y G7 tienen una respuesta elástica predominante  $G' > G''$ , es decir, que el comportamiento de dichos hidrogeles también es parecido al de un sólido. Además, se alcanzan valores de  $\gamma_c$  50 y 79 % para G6 y G7, respectivamente.

A pesar que los hidrogeles G6 y G7 son basados en derivados de quitosana (DCHI), tienen diferentes composiciones. Mientras G6 fue sintetizado con el agente entrecruzador MBAm y DCHI, G7 no contiene moles de MBAm y sólo DCHI. Es decir, que el derivado de quitosana en el hidrogel G7 actúa único agente entrecruzante. El hidrogel G7 posee una LVR en un rango de deformaciones que van desde 0.1 hasta un valor crítico de  $\gamma_c$  79. Las interacciones que se forman entre el derivado de quitosana y la poliacrilamida generan una estructura estable, así como una magnitud de módulo  $G'$  estable dentro del LVR.



**Figura 40. Evolución de  $G'$  y  $G''$  en función al barrido de deformación aplicado para los hidrogeles G6 y G7.**

En todos los casos evaluados de los hidrogeles G1 – G7 en función de la deformación por cizalla, se llega a observar que al seguir incrementando los valores de deformación aplicada, los valores de los módulos  $G'$  y  $G''$  van oscilando con una mayor amplitud fuera del LVR. Es decir, que el comportamiento elástico ( $G'$ ) es afectado por la deformación y los valores decaen. Por el contrario, va predominando la respuesta donde el hidrogel es más parecido a un fluido y el valor del módulo viscoso  $G''$  va aumentando en magnitud. Esta situación ocurre fuera del LVR, y es asociado a ciertos cambios que ocurren a nivel estructural de la red polimérica que incluyen el rompimiento de enlaces intermoleculares débiles (98) que puedan estar presentes debido a las interacciones entre las cadenas poliméricas y las moléculas de agua en las diferentes composiciones de los hidrogeles G1 – G7.

Los promedios de los valores de la deformación crítica por cizalla de todos los hidrogeles G1 – G7 se encuentran resumidos en la tabla 5. Se puede observar que los dos tipos de hidrogeles derivados de quitosana tienen los valores más altos de  $\gamma_c$ , de manera que este tipo de composiciones son los más estables estructuralmente. Se debe resaltar que en el caso del hidrogel G7, este presenta el valor más alto de  $\gamma_c= 79$ .

**Tabla 5. Valores de deformación crítica por cizalla de los hidrogeles ( $\gamma_c$ ).**

Hidrogel	$\gamma_c$ (%)
G1	25
G2	32
G3	39
G4	32
G5	37
G6	50
G7	79

A partir de los valores del LVR de los hidrogeles G1 – G7, se utiliza un valor determinado ( $\gamma = 10$ ) que se encuentre dentro de LVR para mantenerlo constante en los ensayos oscilatorios de frecuencia angular.

Las figuras 41 y 42 muestran los ensayos oscilatorios de los hidrogeles G1 – G7 en función a la frecuencia angular aplicada a una deformación de 10 % y 25 °C. En todos los casos, se muestra el comportamiento viscoelástico de los hidrogeles, es decir que tienen una zona elástica y otra viscosa, siendo el módulo elástico predominante frente al módulo viscoso ( $G' > G''$ ) para todos los hidrogeles formulados. Además, el módulo  $G'$  fue independiente de la frecuencia angular aplicada, lo cual indica que estos hidrogeles son geles químicos.

La dependencia de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) de los hidrogeles de poliacrilamida (G1 – G3) en función de la frecuencia angular aplicada se muestra en la figura 41. Los valores de  $G'$  obtenidos de la figura 41 para los hidrogeles G1, G2 y G3 son 536, 1011 y 1290 Pa, respectivamente, mientras que los valores para  $G''$  son 21, 19 y 14 Pa, respectivamente. En los tres casos, el  $G'$  se mantiene constante frente al barrido de la frecuencia aplicada, sin embargo, la magnitud varía en función del tipo de hidrogel ensayado. La variación del módulo  $G'$  entre los hidrogeles G1, G2 y G3 pueden ser atribuido a la diferencia en la densidad de entrecruzamiento en estos geles. Así como este factor tuvo influencia en las propiedades morfológicas, térmicas y mecánicas reportadas en las anteriores secciones, se observa en las figuras 41 – 42 que también tiene influencia en las propiedades reológicas.

En el caso de G1, que contiene la menor cantidad de agente entrecruzante genera una menor densidad de entrecruzamiento y a su vez una capacidad de hinchamiento mayor. Estas características generan que la estructura del hidrogel sea más blanda y los valores de  $G'$  sean más bajos que los obtenidos para G2 y G3. A medida que la cantidad usada de MBAm aumenta genera una estructura más rígida, como en el caso de G2, y es posible observar en la figura 39 que el valor de  $G'$  aumenta a 1011 Pa.

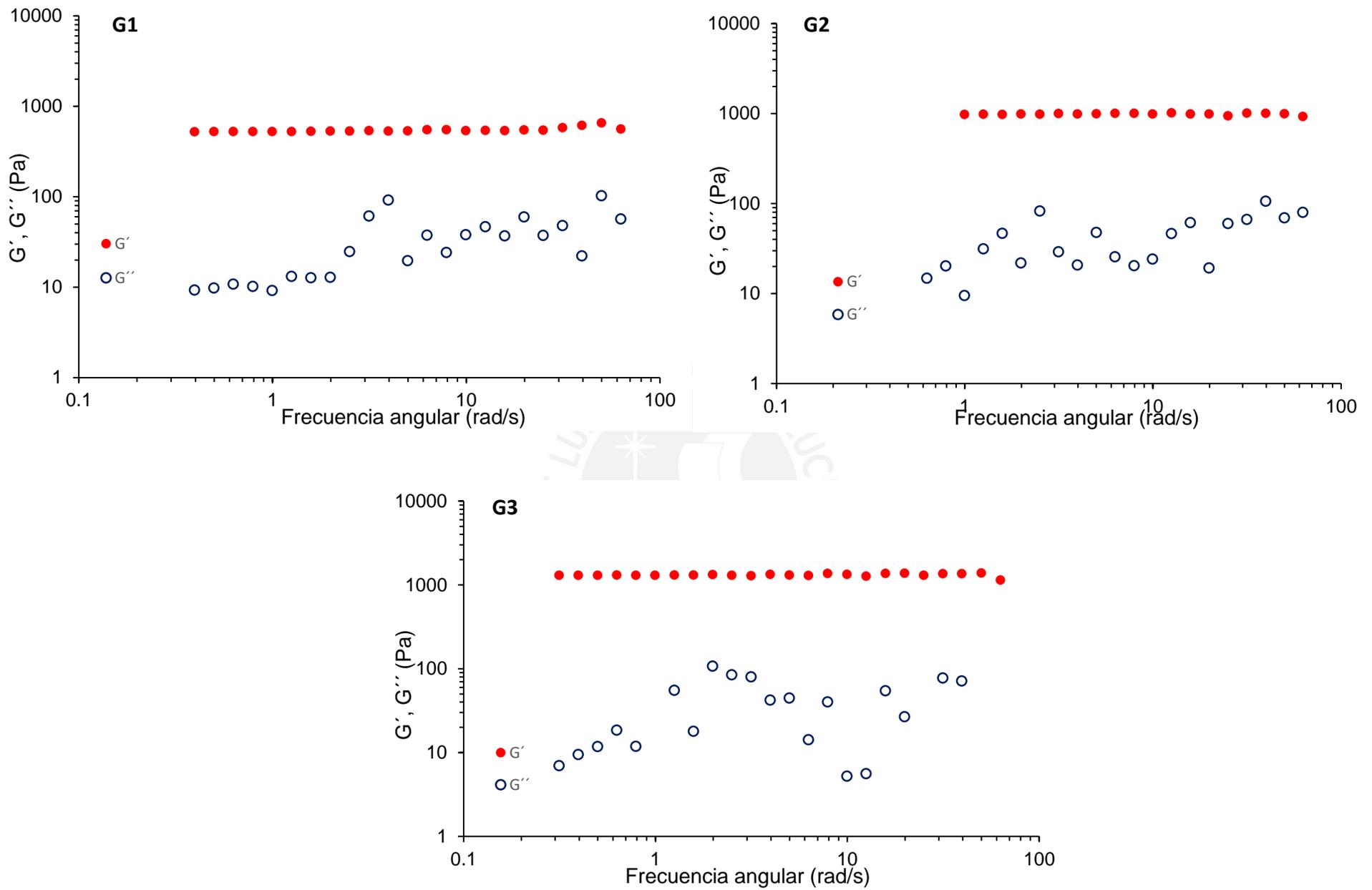


Figura 41. Evolución de  $G'$  y  $G''$  en función de la frecuencia angular de G1, G2 y G3.

La misma tendencia la sigue el hidrogel G3, el cual tiene mayor cantidad de MBAm, y la rigidez de la red polimérica se relaciona con la densidad de entrecruzamiento, por lo que este tipo de hidrogel basado en poliacrilamida tiene el valor más alto de  $G'$  en comparación con los valores de G1 y G2.

La figura 42 muestra la variación del módulo  $G'$  y  $G''$  en función de la frecuencia angular aplicada en ensayos reológicos oscilatorios para los hidrogeles G4, G5, G6 y G7. Los hidrogeles G4 y G5 basados en acrilamida y ácido acrílico difieren en su síntesis respecto al contenido del agente de acoplamiento EDAC, el cual sí es incluido en la composición del hidrogel G5. Los valores promedio de  $G'$  para G4 y G5 obtenidos de la figura 42 son 485 y 895 Pa, respectivamente. Siendo el valor de  $G'$  de G4 menor a los reportados para G1, G2 y G3. Por otro lado, el valor del módulo  $G'$  de G5 es mayor a G1, pero menor a las magnitudes observadas para los  $G'$  de G2 y G3.

Estas diferencias en la respuesta de los hidrogeles frente a la frecuencia angular aplicada podrían relacionarse con el efecto que ejerce la capacidad de hinchamiento. Es así que, siendo el  $H_{G4}$  de mayor valor ( $H_{G4} = 6800$ ) entre todos los hidrogeles, también posee el valor de  $G'$  más bajo 485 Pa, ya que resulta tener una estructura blanda.

Las propiedades reológicas de los hidrogeles basados en derivados de quitosana (DCHI) G6 y G7 se muestra en la figura 44. Se puede observar que el módulo  $G'$  y  $G''$  en función de la frecuencia angular aplicada es diferente en los dos casos, siendo el valor de  $G'$  promedio de 1676 y 2243 Pa para G6 y G7, respectivamente.

La diferencia entre la composición de los hidrogeles G6 y G7 radica en el contenido del agente entrecruzante MBAm. G6 fue sintetizado con MBA y DCHI, mientras que G7 no contiene moles de MBA y sólo hay interacciones de DCHI con la matriz de poliacrilamida.

El resumen de las propiedades reológicas de los hidrogeles G1 – G7 se muestran en la tabla 4. Se observa que para G7, los valores de ambos módulos son los más altos.

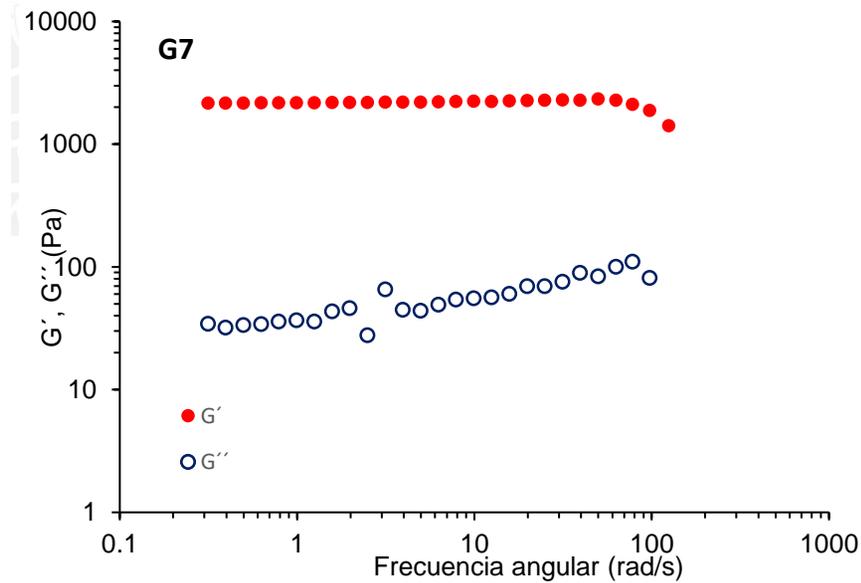
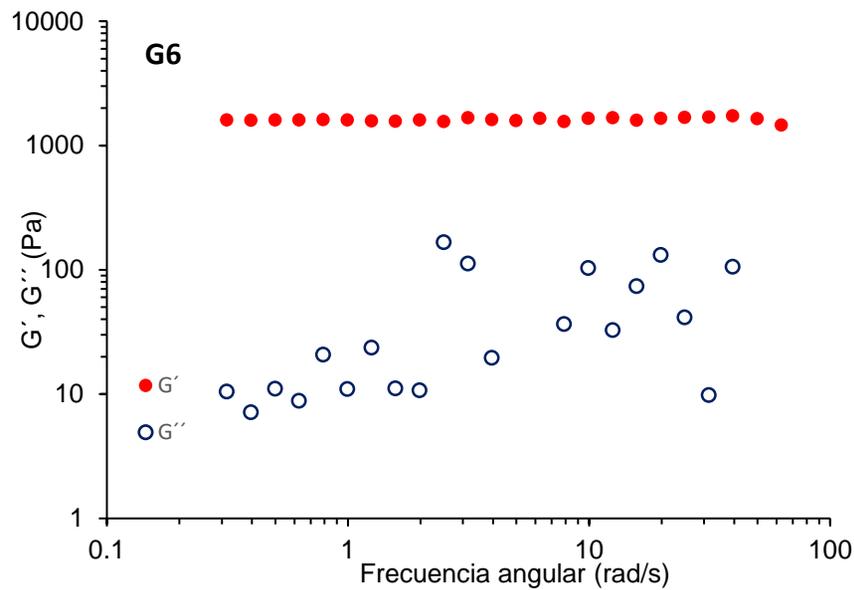
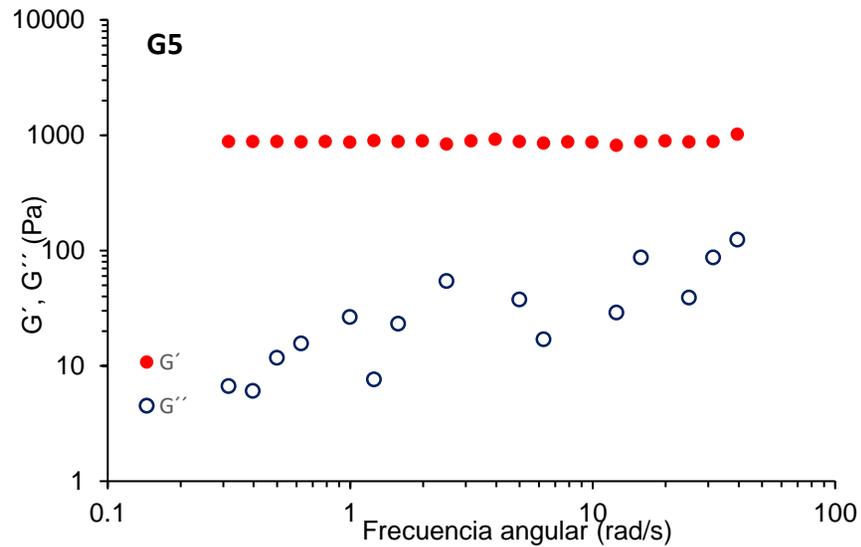
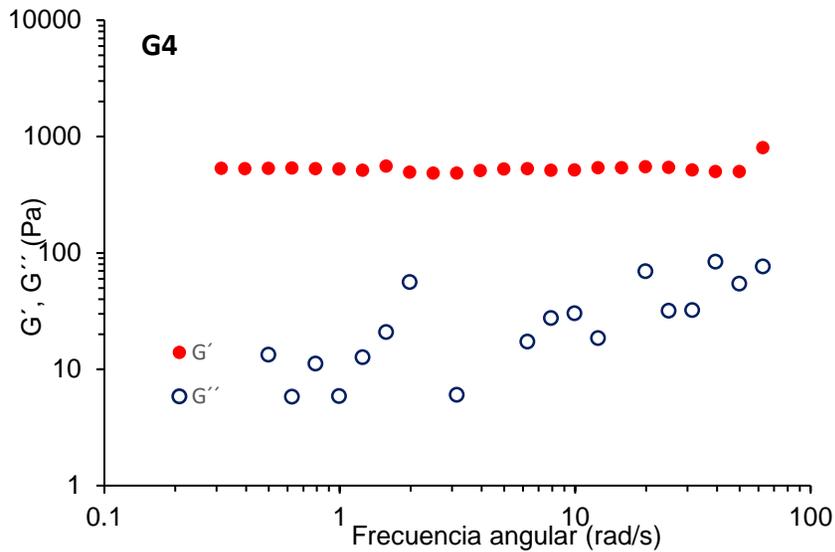


Figura 42. Evolución de  $G'$  y  $G''$  en función de la frecuencia angular de G4, G5, G6 y G7.

Cabe resaltar que los parámetros viscoelásticos obtenidos de las gráficas están relacionados con la energía almacenada y disipada durante los ensayos. Es así que el módulo elástico  $G'$  mide la elasticidad del material y es un indicativo de la capacidad del material ensayado para almacenar energía, mientras que el módulo viscoso  $G''$  está relacionado con la capacidad del material para disipar energía, la cual se pierde en forma de calor. El valor obtenido por la  $\tan(\delta)$  que es la relación entre los módulos  $G''/G'$ , representa la energía disipada en relación a la almacenada.

**Tabla 6. Propiedades viscoelásticas de los hidrogeles G1 – G7.**

Hidrogel	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)	$\tan(\delta)$
G1	536	21	0,039
G2	1011	19	0,019
G3	1313	14	0,011
G4	485	28	0,058
G5	895	30	0,033
G6	1696	20	0,012
G7	2243	36	0,016

Los parámetros teóricos de la red de los hidrogeles pueden ser calculados a partir de los valores obtenidos del módulo de almacenamiento  $G'$  de los ensayos de frecuencia oscilatoria. Cordier et al. (99) indicó que la teoría de elasticidad del caucho puede ser usada para caracterizar las redes que están entrecruzadas de forma covalente o por interacciones físicas como enmañaramiento o puentes de hidrógeno (100). Es así que la energía inducida de un ensayo oscilatorio es almacenada elásticamente por el segmento de la cadena polimérica que está entre dos puntos de entrecruzamiento, por lo que la densidad de enlaces entrecruzados ( $\nu$ ), se puede calcular directamente utilizando el modelo de Flory y Erman (101) que predice que,  $G'$  viene dada por:

$$G' = \nu k_B T$$

Donde:

$k_B$  = Constante de Boltzman

$T$  = Temperatura a la cual se midió  $G'$

$\nu$  = densidad teórica de enlaces entrecruzados

De esta manera, se calculó teóricamente la densidad de entrecruzamiento de los hidrogeles G1 – G7, en la cual los valores se resumen en la siguiente tabla 7. Los hidrogeles de PAAm G1 – G3 corresponden a los que varían el contenido de MBAm en su formulación, y su efecto se ve reflejado en las propiedades mecánicas, reológicas y de hinchamiento. Los hidrogeles G4 y G5 son los hidrogeles que se fracturan bajo compresión y tienen una mayor capacidad de hinchamiento en agua. El hidrogel G6, posee dos tipos de entrecruzamiento generados por la adición de MBAm y los que se generan por la matriz del DCHI. Por último, el hidrogel G7 presenta sólo entrecruzamientos generados por el DCHI.

Si se relaciona los valores teóricos con las cantidades y el tipo de agente de entrecruzamiento que hay en las estructuras de los hidrogeles, se ha podido concluir que afecta a sus propiedades y que a mayor densidad de entrecruzamiento, aumentan las propiedades mecánicas, el módulo elástico y disminuye la capacidad de hinchamiento en agua.

**Tabla 7. Densidad de entrecruzamiento teórico de los hidrogeles G1 – G7.**

Hidrogel	$\nu$ ( $\times 10^{23} m^3$ )
G1	1,303
G2	2,457
G3	3,191
G4	1,179
G5	2,175
G6	4,122
G7	5,452

## 8. CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se logró obtener derivados de quitosana con ácido acrílico mediante el uso de un agente de acoplamiento. Además, se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de los siete tipos de hidrogeles formulados basados en acrilamida, ácido acrílico y el derivado de quitosana que, al ser secados en estufa a 50 °C o hinchados en agua, conservan la forma inicial del molde en el cual fueron sintetizados. Además, la formulación determina las características morfológicas, capacidad de hinchamiento y las propiedades mecánicas finales de los hidrogeles.

Las morfologías internas de todos los hidrogeles G1 – G7 fueron observadas a través de micrografías obtenidas por SEM, las cuales confirmaron estructuras 3D con poros interconectados en todos los hidrogeles sintetizados. El hidrogel que tuvo el menor valor promedio de tamaño de poro fue G3 con 5,28  $\mu\text{m}$ , mientras que G4 tuvo 23,6  $\mu\text{m}$  de promedio, siendo estos los tamaños de poros más grandes en comparación con las demás muestras. G1, G4, G6 y G7 presentaron morfologías de poros más uniformes que en comparación con G2, G3 y G5, en las cuales se identificaron zonas con poros colapsados.

El efecto en la morfología debido a las diferentes composiciones de los hidrogeles se vio reflejada en la capacidad de hinchamiento en agua (H). Es así que para hidrogeles sólo de poliacrilamida, el que obtuvo mayor capacidad de absorción en su estructura es el de menor densidad de entrecruzamiento. Es así que  $H_{G1} > H_{G2} > H_{G3}$  debido a que la cantidad de agente entrecruzante MBAm es mayor para la formulación de G3.

La fractura mecánica de los hidrogeles al ser comprimidos está relacionada con la pérdida de las propiedades de un material. De los siete tipos de hidrogeles sintetizados, se observó que G4 y G5 se fracturaron al ser comprimidos. Esta baja capacidad de resistencia a la compresión puede estar relacionada con el alto contenido de agua de estos hidrogeles, lo cual los convierte en materiales más blandos que pueden fallar a valores bajos de la carga aplicada.

El efecto de los derivados de quitosana en la formulación de los hidrogeles se vio reflejada en el aumento del módulo elástico, es decir, que la adición de DCHI mejora las propiedades mecánicas. Por otro lado, de las propiedades reológicas medidas en función de los módulos  $G'$  y  $G''$ , varían dependiendo de la composición de cada hidrogel. Siendo los hidrogeles G6 y G7 con derivado de quitosana los que presentaron mayor valor del módulo elástico  $G'$ .

Las propiedades reológicas de los hidrogeles se analizaron en función de los módulos elástico  $G'$  y viscoso  $G''$ , dando un comportamiento elástico predominante para todos los hidrogeles ( $G' > G''$ ). Además, todos los hidrogeles mostraron un rango viscoelástico lineal (LVR), el cual está relacionado con la estabilidad de las estructuras en un rango de deformación por cizalla. Siendo el hidrogel G7, el que presenta el valor más alto de  $\gamma_c = 79\%$ . Lo cual indicaría que existe un efecto sobre la estabilidad estructural del hidrogel cuando el derivado de quitosana actúa como entrecruzador de la matriz de poliacrilamida.

De los ensayos de reología oscilatorios en función a la frecuencia aplicada, se concluyó que todos los hidrogeles muestran características de geles químicos. Además, a partir de estos ensayos se calculó la densidad de entrecruzamiento teórico de los hidrogeles haciendo uso de la teoría de elasticidad del caucho. De esta manera se pudo corroborar la alta densidad de entrecruzamiento de los hidrogeles derivados de quitosana G6 y G7 comparados con los hidrogeles de PAAm.

Es posible concluir que se puede modular las propiedades mecánicas no solo con la variación del número de moles usados de agente de entrecruzador, sino también con el tipo de agente, así, por ejemplo, utilizar un polímero como la quitosana produce un efecto importante en las propiedades del hidrogel. Para futuras aplicaciones en ingeniería de tejidos, que requieren materiales que soporten cargas y su estructura no se destruya, los hidrogeles derivados de quitosana serían una opción a tomar en cuenta.

## 9. RECOMENDACIONES

- Se propone investigar más a fondo el efecto del contenido de agente entrecruzante para la síntesis de hidrogeles con derivados de quitosana. Mayor número de moles podría ser investigado, de esta manera se podría seguir mejorando las propiedades mecánicas de dichos hidrogeles.
- También es recomendable investigar el efecto del agente de acoplamiento, el cual permite injertar moléculas como el ácido acrílico en la estructura de la quitosana, y de este modo generar puntos de entrecruzamiento con otra matriz como el PAAm.
- El módulo elástico de compresión se debe calcular como la pendiente de la zona lineal de la gráfica de esfuerzo – deformación de los hidrogeles.
- Para los ensayos reológicos, se recomienda usar geometrías con base moleteada para evitar el desliz de los hidrogeles y esto genere datos erróneos.
- En la presente tesis se ha conocido las propiedades de hinchamiento, térmicas, mecánicas y reológicas de los hidrogeles. Por lo que se recomienda seguir investigando para poder usar dichas formulaciones de los hidrogeles derivados de quitosana en potenciales aplicaciones en el campo biomédico.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Bao Y, Ma J, Li N. Synthesis and swelling behaviors of sodium carboxymethyl cellulose-g-poly(AA-co-AM-co-AMPS)/MMT superabsorbent hydrogel. *Carbohydr Polym.* 2011;84(1):76–82.
2. Zhang J, Wang Q, Wang A. Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(acrylic acid)/attapulgit superabsorbent composites. *Carbohydr Polym.* 2007;68(2):367–74.
3. Cipriano BH, Banik SJ, Sharma R, Rumore D, Hwang W, Briber RM, et al. Superabsorbent hydrogels that are robust and highly stretchable. *Macromolecules.* 2014;47(13):4445–52.
4. Dragan ES, Lazar MM, Dinu MV, Doroftei F. Macroporous composite IPN hydrogels based on poly(acrylamide) and chitosan with tuned swelling and sorption of cationic dyes. *Chem Eng J.* 2012;204–206:198–209.
5. Sun H, Yang H, Huang W, Zhang S. Immobilization of laccase in a sponge-like hydrogel for enhanced durability in enzymatic degradation of dye pollutants. *J Colloid Interface Sci.* 2015;450:353–60.
6. Kim SJ, Shin SR, Kim NG, Kim SI. Swelling Behavior of Semi-Interpenetrating Polymer Network Hydrogels Based on Chitosan and Poly(acryl amide). *J Macromol Sci Part A.* 2005;42(8):1073–83.
7. Hoare TR, Kohane DS. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer (Guildf).* 2008;49(8):1993–2007.
8. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(1):83–99.
9. Co-investigator N. A Chitosan–Polymer Hydrogel Bead System For A Metformin HCl Controlled Release Oral Dosage Form. *J Chem Inf Model.* 2013;53(May):1689–99.
10. Van Vlierberghe S, Dubruel P, Schacht E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: A review. *Biomacromolecules.* 2011;12(5):1387–408.
11. Sun JY, Zhao X, Illeperuma WRK, Chaudhuri O, Oh KH, Mooney DJ, et al. Highly stretchable and tough hydrogels. *Nature.* 2012;489(7414):133–6.
12. Landers R, Hübner U, Schmelzeisen R, Mülhaupt R. Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. *Biomaterials.* 2002;23(23):4437–47.
13. Zhou Y, Zhao S, Zhang C, Liang K, Li J, Yang H, et al. Photopolymerized maleilated chitosan/thiol-terminated poly (vinyl alcohol) hydrogels as potential tissue engineering scaffolds. *Carbohydr Polym.* 2018;184:383–9.
14. Gong JP, Katsuyama Y, Kurokawa T, Osada Y. Double-network hydrogels with extremely high mechanical strength. *Adv Mater.* 2003;15(14):1155–8.
15. Caló E, Khutoryanskiy V V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur Polym J.* 2015;65:252–67.

16. Al-salim MAJ. Preparation and characterization of chitosan- ullulan hydrogel and its application for adsorption of erichrome black T from aqueous solutions. [Master's thesis]. Gazimağusa: Eastern Mediterranean University; 2014.
17. Zhou Y, Liang K, Zhao S, Zhang C, Li J, Yang H, et al. Photopolymerized maleilated chitosan/methacrylated silk fibroin micro/nanocomposite hydrogels as potential scaffolds for cartilage tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2018;108:383–90.
18. Shariatinia Z, Jalali AM. Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications. *Int J Biol Macromol*. 2018;115:194–220.
19. Ren L. Preparation, Characterization and in-Vitro Evaluation of Chitosan-Based Smart Hydrogels for Controlled Drug Release. Thesis. Massey University; 2009.
20. Xu D, Huang J, Zhao D, Ding B, Zhang L, Cai J. High-Flexibility, High-Toughness Double-Cross-Linked Chitin Hydrogels by Sequential Chemical and Physical Cross-Linkings. 2016;5844–9.
21. Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res*. 2015;6(2):105–21.
22. Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: From controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discov Today*. 2002;7(10):569–79.
23. Shantha KL, Harding DRK. Synthesis and evaluation of sucrose-containing polymeric hydrogels for oral drug delivery. *J Appl Polym Sci*. 2002;84(14):2597–604.
24. Gibas I, Janik H. Review: Synthetic Polymer Hydrogels for Biomedical Applications. *Chem Chem Technol*. 2010;4(4):297–305.
25. Farahani V, Fariba G, Samira V-F. Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. *Iran Polym J*. 2010;19(5):375–98.
26. Ullah F, Othman MBH, Javed F, Ahmad Z, Akil HM. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Mater Sci Eng C*. 2015;57:414–33.
27. Nakayama A, Kakugo A, Gong JP, Osada Y, Takai M, Erata T, et al. High mechanical strength double-network hydrogel with bacterial cellulose. *Adv Funct Mater*. 2004;14(11):1124–8.
28. Yan C, Pochan DJ. Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications. *Chem Soc Rev*. 2010;39(9):3528–40.
29. Mezger TG. *The Rheology Handbook* (2nd Ed.). Vincentz. 2006. p. 180.
30. Barnes HA. *Rheology: Principles, Measurements and Applications*. Vol. 86, Powder Technology. 2003. 313 p.
31. Suh JF, Matthew HWT. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering : a review. *Biomaterials*. 2000;21:2589–98.
32. Chapekar MS. *Tissue Engineering : Challenges and Opportunities*. *J Biomed Mater Res*. 2000;53:617–20.
33. Kumirska J, Kaczy Z, Bychowska A. Application of Spectroscopic Methods for

Structural Analysis of Chitin and Chitosan. *Mar Drugs*. 2010;8:1567–636.

34. Boarin-Alcalde L, Graciano-Fonseca G. Alkali process for chitin extraction and chitosan production from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scales escamas de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Lat Am J Aquat Res*. 2016;44(4):683–8.
35. Kumar MNVR. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym*. 2000;46:1–27.
36. Engesland A. Hydrogels of Natural Origin in Wound Healing: Formulation Development. Thesis. University of Tromsø; 2010.
37. Van De Velde K, Kiekens P. Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state<sup>13</sup>C NMR. *Carbohydr Polym*. 2004;58(4):409–16.
38. Badawy MEI, Rabea EI. A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection. *Int J Carbohydr Chem*. 2011;2011:1–29.
39. Kong M, Guang X, Xing K, Jin H. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int J Food Microbiol*. 2010;144(1):51–63.
40. Kim S, Requejo KI, Nakamatsu J, Gonzales KN, Torres FG, Cavaco-Paulo A. Modulating antioxidant activity and the controlled release capability of laccase mediated catechin grafting of chitosan. *Process Biochem*. 2017;59:65–76.
41. Jiang X, Xiang N, Wang J, Zhao Y, Hou L. Preparation and characterization of hybrid double network chitosan/poly(acrylic amide-acrylic acid) high toughness hydrogel through Al<sup>3+</sup>crosslinking. *Carbohydr Polym*. 2017;173:1–20.
42. Yang Y, Wang X, Yang F, Shen H, Wu D. A universal soaking strategy to convert composite hydrogels into extremely tough and rapidly recoverable double-network hydrogels. *Adv Mater*. 2016;7178–84.
43. Yan Y, Li M, Yang D, Wang Q, Liang F, Qu X, et al. Construction of Injectable Double-Network Hydrogels for Cell Delivery. *Biomacromolecules*. 2017;18(7):2128–38.
44. Liang S, Liu L, Huang Q, Yam KL. Preparation of single or double-network chitosan/poly(vinyl alcohol) gel films through selectively cross-linking method. *Carbohydr Polym*. 2009;77(4):718–24.
45. Zhang J, Wang L, Wang A. Preparation and properties of chitosan-g-poly(acrylic acid)/montmorillonite superabsorbent nanocomposite via in situ intercalative polymerization. *Ind Eng Chem Res*. 2007;2497–502.
46. Thakur VK, Thakur MK. Recent advances in graft copolymerization and applications of chitosan: A review. *ACS Sustain Chem Eng*. 2014;2(12):2637–52.
47. Alves NM, Mano JF. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *Int J Biol Macromol*. 2008;43(5):401–14.
48. Zohuriaan-mehr MJ. Advances in chitin and chitosan modification through Graft copolymerization: A comprehensive Review. *Polym J*. 2005;14(3):235–65.

49. Jenkins DW, Hudson SM. Review of vinyl graft copolymerization featuring recent advances toward controlled radical-based reactions and illustrated with chitin/chitosan trunk polymers. *Chem Rev.* 2001;101(11):3245–73.
50. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2006;31(7):603–32.
51. Li P, Zhao J, Chen Y, Cheng B, Yu Z, Zhao Y, et al. Preparation and characterization of chitosan physical hydrogels with enhanced mechanical and antibacterial properties. *Carbohydr Polym.* 2017;157:1383–92.
52. Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, Nair S V., Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv.* 2011;29(3):322–37.
53. Ma S, Yu B, Pei X, Zhou F. Structural hydrogels. *Polym (United Kingdom).* 2016;98:516–35.
54. Qi B, Yu A, Zhu S, Chen B, Li Y. The preparation and cytocompatibility of injectable thermosensitive chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogel. *J Huazhong Univ Sci Technol - Med Sci.* 2010;30(1):89–93.
55. Lejardi A, Hernández R, Criado M, Santos JI, Etxeberria A, Sarasua JR, et al. Novel hydrogels of chitosan and poly(vinyl alcohol)-g-glycolic acid copolymer with enhanced rheological properties. *Carbohydr Polym.* 2014;103(1):267–73.
56. Zhong C, Wu J, Reinhart-King CA, Chu CC. Synthesis, characterization and cytotoxicity of photo-crosslinked maleic chitosan-polyethylene glycol diacrylate hybrid hydrogels. *Acta Biomater.* 2010;6(10):3908–18.
57. Xu L, Zhang X, Zhu C, Zhang Y, Fu C, Yang B, et al. Nonionic polymer cross-linked chitosan hydrogel: Preparation and bioevaluation. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2013;24(13):1564–74.
58. Bhalla S, Nagpal M. Comparison of various generations of superporous hydrogels based on chitosan-acrylamide and in vitro drug release. *ISRN Pharm.* 2013;2013:1–8.
59. Bocourt Povea C, Rigñack C, Rivero B, Covas P, Bocourt Povea M, Cruz Rigñack J, et al. Síntesis y caracterización de hidrogeles biocompatibles interpenetrados de quitosana y poliacrilamida. *Rev CENIC Ciencias Químicas.* 2008;39(2):70–4.
60. Dragan ES, Perju MM, Dinu MV. Preparation and characterization of IPN composite hydrogels based on polyacrylamide and chitosan and their interaction with ionic dyes. *Carbohydr Polym.* 2012;88(1):270–81.
61. Makarand V. Risbud RRB. Polyacrylamide-Chitosan Hydrogels: In Vitro Biocompatibility and Sustained Antibiotic Release Studies. *Drug Deliv.* 2000;7(2):69–75.
62. Mishra D, Nagpal M, Singh S. Superporous hybrid hydrogels based on polyacrylamide and chitosan: Characterization and in vitro drug release. *Int J Pharm Investig.* 2013;3(2):88.

63. Mahdavinia GR, Pourjavadi A, Hosseinzadeh H, Zohuriaan MJ. Modified chitosan 4. Superabsorbent hydrogels from poly(acrylic acid-co-acrylamide) grafted chitosan with salt- and pH-responsiveness properties. *Eur Polym J*. 2004;40(7):1399–407.
64. Yin L, Fei L, Cui F, Tang C, Yin C. Superporous hydrogels containing poly(acrylic acid-co-acrylamide)/O-carboxymethyl chitosan interpenetrating polymer networks. *Biomaterials*. 2007;28(6):1258–66.
65. Bocourt M, Bada N, Acosta N, Bucio E, Peniche C. Synthesis and characterization of novel pH-sensitive chitosan-poly(acrylamide-co-itaconic acid) hydrogels. *Polym Int*. 2014;63(9):1715–23.
66. Bodugoz-Senturk H, Macias CE, Kung JH, Muratoglu OK. Poly(vinyl alcohol)-acrylamide hydrogels as load-bearing cartilage substitute. *Biomaterials*. 2009;30(4):589–96.
67. Liu M, Huang J, Luo B, Zhou C. Tough and highly stretchable polyacrylamide nanocomposite hydrogels with chitin nanocrystals. *Int J Biol Macromol*. 2015;78:23–31.
68. Tanaka Y, Fukao K, Miyamoto Y. Fracture energy of gels. *Eur Phys J E*. 2000;3(4):395–401.
69. Okay O, Oppermann W. Polyacrylamide-clay nanocomposite hydrogels: Rheological and light scattering characterization. *Macromolecules*. 2007;40(9):3378–87.
70. Souza MG de, Figueroa de Gil Y, Ramírez AL, Prin JL, Guzmán PJ, Otero B, et al. Hidrogeles de Poli(Acrilamida): evaluación de su comportamiento en fluido fisiológico simulado (SBF). *Rev Iberoam polímeros*. 2014;15(4):198–210.
71. Ramirez A. Estudio de la difusión y cinética de hinchamiento en hidrogeles de poli(acrilamida). *Rev Iberoam polímeros*. 2011;12(6):292–9.
72. Ortiz Lucio E, Cruz RA, Cruz Gómez J, Mendoza Martínez AM, Morales Cepeda AB. Síntesis Y Caracterización De Hidrogeles Obtenidos a Partir De Acrilamida Y Metilcelulosa. *Rev Iberoam Polímeros Vol Iberoam Polim*. 2006;7(74):247–53.
73. Odian G. Principles of polymerization. John Wiley & Sons; 2004. 1–839 p.
74. Dietrich Braun, Cherdrón H, Voit M, Rehahn Helmut, Ritter Brigitte. *Polymer Synthesis: Theory and Practice*. 2005.
75. Karadağ E, Saraydin D, Çetinkaya S, Güven O. In vitro swelling studies and preliminary biocompatibility evaluation of acrylamide-based hydrogels. *Biomaterials*. 1996;17(1):67–70.
76. Saraydin D, Ünver-Saraydin S, Karadağ E, Koptagel E, Güven O. In vivo biocompatibility of radiation crosslinked acrylamide copolymers. *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect B Beam Interact with Mater Atoms*. 2004;217(2):281–92.
77. Chauhan S. Acrylic acid and methacrylic acid based hydrogels-A review. *Der Chem Sin*. 2014;4(3):750–5.
78. Palazon F, Montenegro Benavides C, Leonard D, Souteyrand E, Chevolut Y, Cloarec JP. Carbodiimide/NHS derivatization of COOH-terminated SAMs: Activation

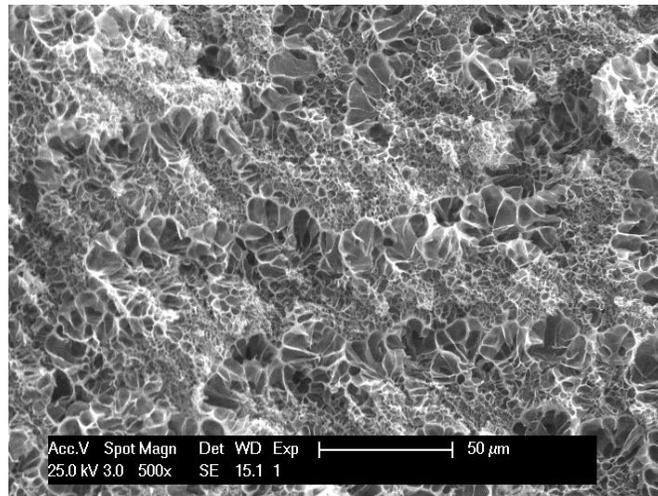
or byproduct formation? *Langmuir*. 2014;30(16):4545–50.

79. Fernandes SCM, Alonso-Varona A, Palomares T, Zubillaga V, Labidi J, Bulone V. Exploiting Mycosporines as Natural Molecular Sunscreens for the Fabrication of UV-Absorbing Green Materials. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(30):16558–64.
80. Aytekin AO, Morimura S, Kida K. Synthesis of chitosan-caffeic acid derivatives and evaluation of their antioxidant activities. *J Biosci Bioeng*. 2011;111(2):212–6.
81. Werle M, Takeuchi H. Chitosan-aprotinin coated liposomes for oral peptide delivery: Development, characterisation and in vivo evaluation. *Int J Pharm*. 2009;370(1–2):26–32.
82. Kast CE, Bernkop-Schnürch A. Thiolated polymers - thiomers: Development and in vitro evaluation of chitosan-thioglycolic acid conjugates. *Biomaterials*. 2001;22(17):2345–52.
83. Bernkop-Schnürch A, Hopf TE. Synthesis and in vitro evaluation of chitosan-thioglycolic acid conjugates. *Sci Pharm*. 2001;69(2):109–18.
84. Grabovac V, Bernkop-Schnürch A. Development and In Vitro Evaluation of Surface Modified Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles with Chitosan-4-Thiobutylamidine. *Drug Dev Ind Pharm*. 2007;33(7):767–74.
85. Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Argüelles-Monal W., Desbrières, J., Rinaudo M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer (Guildf)*. 2001;42(8):3569–80.
86. Duarte ML, Ferreira MC, Marvão MR, Rocha J. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *Int J Biol Macromol*. 2002;31(1–3):1–8.
87. Bhattarai N, Ramay HR, Chou SH, Zhang M. Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolonged drug delivery. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(2):181–7.
88. Ivazeta J. Obtención de quitosanas con alto grado de desacetilación. Pontificia universidad católica del Perú; 2018.
89. Mejía IM, Hernández CJ. Physicochemical characterization of chitosan for its application as a metal biosorbent. *Revciuni*. 2007. p. 1–5, Vol 11.
90. Zhang XZ, Wu DQ, Chu CC. Effect of the crosslinking level on the properties of temperature-sensitive poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels. *J Polym Sci Part B Polym Phys*. 2003;41(6):582–93.
91. Sakurai K, Maegawa T, Takahashi T. Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer (Guildf)*. 2000;41(19):7051–6.
92. Zhou C, Wu Q. A novel polyacrylamide nanocomposite hydrogel reinforced with natural chitosan nanofibers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2011;84(1):155–62.
93. Xia YQ, Guo TY, Song MD, Zhang BH, Zhang BL. Hemoglobin recognition by imprinting in semi-interpenetrating polymer network hydrogel based on

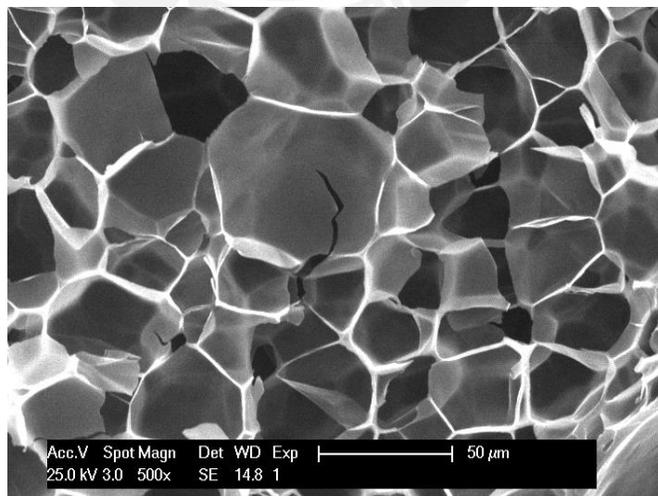
- polyacrylamide and chitosan. *Biomacromolecules*. 2005;6(5):2601–6.
94. Saber-Samandari S, Gazi M, Yilmaz E. UV-induced synthesis of chitosan-g-polyacrylamide semi-IPN superabsorbent hydrogels. *Polym Bull*. 2012;68(6):1623–39.
  95. Sokker HH, El-Sawy NM, Hassan MA, El-Anadouli BE. Adsorption of crude oil from aqueous solution by hydrogel of chitosan based polyacrylamide prepared by radiation induced graft polymerization. *J Hazard Mater*. 2011;190(1–3):359–65.
  96. Yang F, Tadepalli V, Wiley BJ. 3D Printing of a Double Network Hydrogel with a Compression Strength and Elastic Modulus Greater than those of Cartilage. *ACS Biomater Sci Eng*. 2017;3(5):863–9.
  97. Liu S, Li L. Ultrastretchable and Self-Healing Double-Network Hydrogel for 3D Printing and Strain Sensor. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(31):26429–37.
  98. Wong RSH, Ashton M, Dodou K. Effect of crosslinking agent concentration on the properties of unmedicated hydrogels. *Pharmaceutics*. 2015;7(3):305–19.
  99. Cordier P, Tournilhac F, Soulié-Ziakovic C, Leibler L. Self-healing and thermoreversible rubber from supramolecular assembly. *Nature*. 2008;451(7181):977–80.
  100. Cui L, Gao S, Song X, Huang L, Dong H, Liu J, et al. Preparation and characterization of chitosan membranes. *RSC Adv*. 2018;8(50):28433–9.
  101. Mark JE, B. Erman. *Rubberlike Elasticity: A Molecular Primer*, John Wiley & Sons, New York, 1988.

## 11. ANEXOS

Se estudió la morfología de los hidrogeles a un tiempo determinado de absorción de agua y cuando estaban hinchados en el estado de equilibrio (peso constante) con el fin de conocer las diferencias entre los tamaños de los poros. Esta diferencia se puede apreciar en las Figuras 43 y 44, las cuales fueron adquiridas con los mismos aumentos (1000x) a fin de comparación.



**Figura 43. Micrografía SEM representativa del hidrogel hinchado en el tiempo ( $t= 5h$ ).**



**Figura 44. Micrografía SEM representativa de hidrogel hinchado hasta el equilibrio.**