

## HIDROGELES HÍBRIDOS DE QUITOSANO Y POLIETILENGLICOL (QUIT:PEG) PARA POTENCIALES APLICACIONES BIOMÉDICAS

Hellen Elizondo Castillo<sup>1\*</sup>, Sergio Madrigal Carballo<sup>1</sup>, Marianelly Esquivel Alfaro<sup>1</sup>,  
Mary Lopretti<sup>2</sup>, José Vega Baudrit<sup>1,3</sup>

1) Laboratorio de Polímeros POLIUNA, Escuela de Química, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

2) Universidad de la República, UDELAR, Montevideo, Uruguay

3) Laboratorio Nacional de Nanotecnología LANOTEC, Centro Nacional de Alta Tecnología CENAT, Pavas, San José,

Costa Rica Correo electrónico: [jvegab@gmail.com](mailto:jvegab@gmail.com)

*Recibido: Enero de 2021; Aceptado: Febrero de 2021*

**Resumen:** En este trabajo se sintetizaron hidrogeles híbridos de quitosano y polietilenglicol (QUIT:PEG) utilizando PEG de diferentes masas moleculares y en proporciones variadas, con el objetivo de determinar las condiciones de formulación óptimas para obtener la mejor relación entre la matriz y el entrecruzante. Las pruebas de caracterización de los hidrogeles formulados, permitieron comprobar la eficacia del proceso de modificación de la matriz polimérica de quitosano, mediante la adición de polietilenglicol. Los ensayos permiten concluir que se produce un efecto entrecruzante de tipo físico sobre la matriz polimérica bidimensional de los hidrogeles de quitosano, al interaccionar con el polietilenglicol. Conforme se adicionó entrecruzante a la matriz, el hidrogel se tornó más estable al entrar en contacto con líquidos, esto demostrado por su capacidad de hinchamiento y menor degradación, comparado al hidrogel sin modificar, se determinó que el sistema 90:10, es el más adecuado para ensayos de aplicabilidad biomédica. Los ensayos de esterilización de las matrices híbridas mediante irradiación ultravioleta, no presentaron ningún efecto significativo sobre las propiedades físicas y químicas del biomaterial. Adicionalmente este proceso de esterilización permitió eliminar de forma efectiva hasta un 100% el crecimiento de las bacterias, hongos y levaduras que contenían la matriz sin irradiar.

**Abstract:** In this paper were synthesized hybrid hydrogels from chitosan and polyethylene glycol (QUIT: PEG) formulated with different molecular weights PEG and variable proportions, with the objective of determining the optimal formulation conditions for the best relationship between the matrix and the crosslinker. Characterization tests of the formulated hydrogels, allowed verifying the effectiveness of the modification of the chitosan polymer matrix by the addition of polyethylene glycol. The physical, thermal and spectroscopic tests applied to the hybrid matrices formulated, allowed to conclude that there is a physical crosslinking effect on the two-dimensional polymeric matrix of chitosan hydrogels, by the interaction with polyethylene glycol. As crosslinker was added to the matrix, the hydrogel became more stable in contact with fluids, this was demonstrated by their ability to swell and reduced degradation compared to unmodified hydrogel, it was determined that the system 90:10, is the most suitable system for biomedical applicability. The assays of sterilization by ultraviolet irradiation, showed no significant effect on the physical and chemical properties of the biomaterial. Additionally this sterilization process allowed eliminating effectively a 100% the growth of bacteria, fungi and yeasts that contained the non-irradiated matrix.

**Palabras Claves:** Hidrogeles, quitosano, PEG, entrecruzamiento físico.

## 1. Introducción

En el campo de la ciencia y tecnología, algunas de las recientes investigaciones han sido enfocadas hacia la obtención de nuevos materiales. Se realizan investigaciones frecuentes en el desarrollo de biomateriales como una alternativa a la sustitución de materiales sintéticos, a partir de polímeros de origen natural.

Se denominan biomateriales a los productos empleados para reproducir la función de tejidos vivos en los sistemas biológicos de forma segura, mecánicamente funcional y aceptable fisiológicamente, que son implantados en el cuerpo y que tratan de restaurar el defecto existente. Una limitante para la elección de un material de partida para la elaboración de un biomaterial, es que no genere ninguna reacción al entrar en contacto con el cuerpo, por ello, debe cumplir características como: ser biocompatible, no ser tóxico, ni carcinógeno, ser químicamente estable, o biodegradable en productos no tóxicos, que la resistencia y propiedades mecánicas, características superficiales, el tiempo de fatiga y el peso sean los adecuados, así como su diseño [1].

Los biomateriales se pueden clasificar en: metálicos, cerámicos, polímeros y materiales de origen biológico. Los polímeros naturales tienen una serie de ventajas sobre los sintéticos, ya que no necesitan las agresivas condiciones de transformación. Además, los polisacáridos naturales son abundantes, su producción genera menos costos y poseen condiciones ambientalmente seguras [2]. Debido a su semejanza con las sustancias macromoleculares, el medio biológico es capaz de reconocer y metabolizar, pueden ser degradados por enzimas presentes en los organismos vivos y se evitan los problemas derivados de la toxicidad y estimulación de una respuesta inflamatoria crónica, lo que favorece la aplicación temporal. En bibliografía se mencionan muchas aplicaciones en el campo de la biomedicina [3-10].

Existen muchos tipos de biopolímeros de origen natural, entre los más conocidos y estudiados se pueden mencionar el colágeno, la celulosa, la heparina, alginatos, ácido hialurónico, quitina y quitosano, entre otros [1]. El quitosano es un polisacárido  $\beta$  (1,4) 2-amino-2-D-glucosa ampliamente distribuido en la naturaleza [11]. Es un biopolímero catiónico derivado desacetilado de la quitina, obtenido por tratamiento alcalino, donde los grupos acetamido ( $-\text{NHCOCH}_3$ ) son transformados en grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) [12]. Asimismo, es conocido como uno de los polímeros más atractivos derivados de fuentes renovables, por sus excelentes propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, actividad antimicrobiana, no toxicidad, bioadhesividad, su capacidad de ser metabolizado por determinadas enzimas humanas y su notable afinidad a las proteínas, lo que ha generado que reciba una creciente atención en la industria biotecnológica, farmacéutica, textil, alimenticia y cosmética [13].

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales, que pueden absorber grandes cantidades de agua o de fluidos biológicos, con la capacidad de retener y ceder agua a distintas velocidades según su grado de polimerización [2]. Los geles poliméricos se clasifican según el tipo de entrecruzamiento que genera la red tridimensional (físicos y químicos), en función de la naturaleza del polímero (geles de biopolímeros o de polímeros sintéticos), en función de la forma y tamaño de la configuración del gel (macro y micro geles) y en función del tipo de disolvente (hidrogel, aerogel, xerogel, gel liotrópico u organogel). Una característica estructural fundamental de los geles es que presentan cavidades en las que se puede retener en forma temporal o permanente tanto el disolvente como otro tipo de compuesto que le confiere propiedades específicas [14].

La tendencia actual en investigaciones, busca entrecruzar materiales, mediante la aplicación de una unión física, debido a que se evita la adición del agente entrecruzante, que puede afectar el producto final, ya que, existe la posibilidad que trazas de este queden atrapadas dentro de la superficie del material lo que puede generar compuestos tóxicos debido a que en ocasiones esos agentes presentan esta particularidad, asimismo, se incrementa el costo por la remoción de este tipo de sustancias [15].

El entrecruzamiento es una de las técnicas empleadas para proporcionar mayor resistencia mecánica a los geles, así como la evaluación del efecto plastificante sobre el material de partida, esto con el objetivo de ampliar sus opciones como material de aplicación tecnológica. Entre los agentes que han sido empleados en investigaciones anteriores se pueden mencionar el formaldehído, PEG, compuestos epóxicos, dialdehídos (glutaraldehído y glioxal), almidón y glutaraldehído, entre otros [4].

Un sistema constituido por quitosano modificado con PEG obtenido mediante un procedimiento de gelificación iónica en presencia de un agente que provoca la reticulación del quitosano, permite una eficaz asociación de moléculas biológicamente activas, así como su posterior liberación en un entorno biológico adecuado [16]. La principal fuerzas de atracción por las que se va a dar el entrecruzamiento físico de estos dos materiales, son los enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del polietilenglicol, con los del quitosano, así como los grupos amino.

Son muchos los polímeros que se pueden mezclar con quitosano para formar mezclas de polímeros ligadas de forma no covalente. Si son preparadas apropiadamente, son únicas en diversos aspectos. Primero, porque al mezclar el quitosano con poliéterglicos, cada polímero en la mezcla física mantiene su estructura química original, y por tanto es segura para la administración oral u otras vías. Segundo, las mezclas de polímeros estables son insolubles o al menos se disuelven lentamente en condiciones ácidas y/o básicas. Tercero, estos hidrogeles exhiben propiedades únicas de hinchamiento

y deshinchamiento que no se han encontrado previamente en hidrogeles sintéticos sin reticulación covalente [17].

## **2. Parte Experimental**

### **2.1 Materiales**

El quitosano que se utilizó fue sintetizado en el Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional, este se obtuvo a partir de desechos de camarón, posee un peso molecular de  $2,76 \times 10^5$  Da y un grado de desacetilación de 80,1%. Se empleó además polietilenglicol Sigma Aldrich, con masa molecular de 2000 Da y 8000 Da, y Merck masa molecular 4000 Da.

### **2.2 Elaboración de los hidrogeles de quitosano**

Se prepararon una diluciones de 0,25 % m/v, 0,50 % m/v, 0,75 % m/v y 1,00 % m/v de quitosano en ácido acético al 1,0 % v/v. Para la formación de las películas, se vertió sobre un molde un volumen de 100 mL, posteriormente se colocó en una estufa durante 30 minutos a temperatura de 40 °C a 50 °C, luego las placas con el quitosano se ubicaron en una superficie lisa y nivelada, durante un periodo de tiempo para permitir la evaporación del disolvente.

### **2.3 Elaboración de los hidrogeles QUIT:PEG**

Para los hidrogeles con diversas relaciones QUIT: PEG, para un volumen final de 100 mL, se adicionó lentamente con agitación continua el polietilenglicol al quitosano de 0,75 % m/v. Se obtuvieron relaciones 90:10; 80:20, y 70:30 de quitosano: PEG. Despues de realizada la formulación se asegura el entrecruzamiento con agitación moderada durante 5 minutos, posteriormente se realizó el mismo proceso que con las películas que contienen solo quitosano.

### **2.4 Caracterización de los hidrogeles**

#### **2.4.1 Determinación de la capacidad de hinchamiento**

Se determinó la capacidad de hinchamiento a partir de mediciones gravimétricas durante un tiempo de 24 horas, para lo cual se utilizaron segmentos de tamaño de 1 cm x 1 cm, por triplicado de cada una de las muestras [18].

#### **2.4.2 Análisis dimensional**

Una vez cortadas las películas, se utilizó un micrómetro marca Mitutoyo Absolut N547-800 con el cual se determinó el grosor de las superficies las películas elaboradas. El análisis se llevó a cabo basándose en la metodología descrita en la norma Internacional ASTM D 1005-95, [19] promediando los resultados de cinco mediciones de diferentes secciones de la muestra.

#### 2.4.3 Análisis por Goniometría

Los hidrogeles se sometieron al análisis de goniometría, en el cual se determinó el ángulo de contacto de una gota de líquido al caer sobre la superficie de la película en estudio. Lo anterior permitió identificar el comportamiento respecto a la tensión superficial y las características de humectación, energía libre de superficie y adhesividad de los analitos.

#### 2.4.4 Análisis térmicos

El análisis mediante TGA (Termogravimetría) se llevó a cabo en equipo TA Instruments Q 500, siguiendo el procedimiento basado en la norma ASTM E-1131-03 [20], donde se analizaron muestras de 5-10 mg, en atmósfera inerte de nitrógeno. Por su parte los análisis de DSC se llevaron a cabo en un equipo marca TA Instruments modelo Q 200. Se realizó siguiendo el procedimiento basado en la norma ASTM E-3418-99 [21]., se analizaron muestras con masas entre 5-10 mg, se utilizaron cápsulas de aluminio selladas.

#### 2.5.5 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Se efectuaron los análisis de estos hidrogeles mediante un Microscopio de Fuerza Atómica, marca Asylum Research modelo MFP-3D, la metodología que se siguió fue la planteada por Zamora [22]. El estudio se efectuó a temperatura ambiente, en modo discontinuo.

#### 2.6 Exposición de los hidrogeles a la radiación ultravioleta.

Se expusieron las películas durante 2 y 5 horas, a una radiación con potencia constante de 30 Watts [7]. Adicionalmente se efectuó una siembra microbiológica con hisopado de superficie, a las películas con el objetivo de determinar la efectividad del método de desinfección propuesto, monitoreando las Unidades Formadoras de Colonias de coliformes totales, recuento total de bacterias y hongos y levaduras.

### 3. Resultados y discusión

Con el objetivo de determinar la concentración óptima para desarrollar los hidrogeles, se realizaron películas con concentraciones de quitosano de 0,25 %; 0,5 %; 0,75 %; 1,0 % y 1,75 % m/v; al evaluar sus propiedades y tiempo de evaporación de disolvente, se seleccionó la concentración de 0,75% m/v como la concentración óptima de biopolímero a utilizar en los siguientes experimentos.

Para efectuar la selección del PEG que presente mejores propiedades para efectuar el entrecruzamiento de los hidrogeles se realizaron conjugados en la relación QUIT:PEG 90:10, modificando únicamente la masa molecular del PEG utilizado (2000, 4000 y 8000 Da). Se realizaron varios análisis de todas las muestras, entre ellas análisis termogravimétricos, se determinó que las muestras de quitosano

modificadas por PEG, exhiben tres regiones con pérdida de masa significativa. La primera correspondiente a la degradación del polietilenglicol, que ocurre entre los 40 °C y 110 °C y no se presenta en la matriz formulada con PEG<sub>8000</sub>. El segundo evento térmico, cercano a 280 °C, corresponde a la degradación del quitosano presente como matriz polimérica. El tercero, se da cerca de los 427 °C y corresponde a los procesos de oxidación y descomposición del polietilenglicol incluido dentro de la matriz del biomaterial híbrido. Para el caso del PEG de 4000 Da, hay un evento asociado con una pérdida de masa cerca de los 560,72 °C, diferente a los observados en los otros materiales estudiados, mismo que se puede atribuir a impurezas en la muestra de PEG utilizada.

Los análisis de DSC por su parte indican que se da un primer evento que ocurre cerca de 105 °C y presenta una entalpía positiva, que está asociada a un fenómeno de deshidratación característico de los hidrogeles de alta hidrofilia, a temperaturas de 170 °C a 275 °C sobreviene la transición vítreo por el reordenamiento de las cadenas, previa a un evento exotérmico. Los hidrogeles formulados con PEG de mayor masa molecular presentaran una mayor densidad de cadenas poliméricas y por ende una disminución en las regiones ordenadas en su estructura polimérica. El tercer evento térmico observado tiene lugar cerca de los 290 °C y figura un proceso exotérmico de degradación del quitosano presente en la muestra, con un requerimiento de energía similar para todos los casos, asociado a la concentración constante de biopolímero en todas las formulaciones.

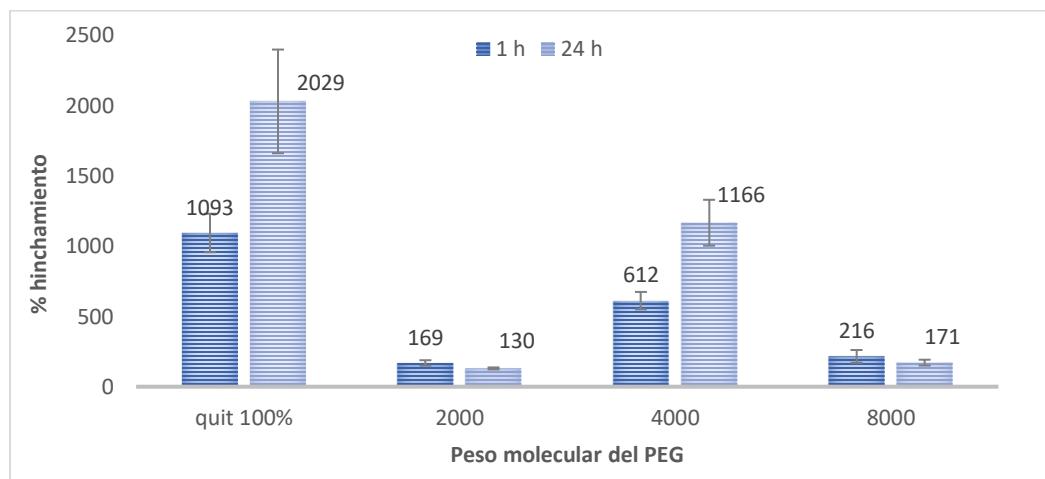


Figura 1. Gráfico comparativo del porcentaje de hinchamiento observado para hidrogeles en proporción 90:10, modificando la masa molecular del polietilenglicol, en periodos de tiempo de 1 hora y 24 horas.

En la figura 1 se presentan los resultados para las pruebas de hinchamiento de los hidrogeles de quitosano modificado con PEG a diferentes masas moleculares, estos permiten concluir que la matriz

polimérica sin agente modificador presenta un hinchamiento significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que cuando se adiciona un agente entrecruzante como el PEG, lo anterior debido a que hay mayor cantidad de grupos hidroxilo disponibles que pueden formar enlaces de hidrógeno y absorber el agua dentro de su estructura. Los análisis de las muestras entrecruzadas con PEG de masa molecular de 2000 y 8000 Da, presentaron porcentajes de hinchamiento significativamente menores a las muestras de quitosano formuladas sin agente modificador o entrecruzada con PEG de masa molecular 4000 Da, sin embargo no mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

Las diferencias observadas en los perfiles de hinchamiento de los hidrogeles de quitosano formulados con PEG 2000 y 8000, justifican el éxito del proceso de entrecruzamiento de la matriz biopolimérica, demostrando que se dio el entrecruzamiento entre los grupos con capacidad de ceder y aceptar electrones, para formar los puentes de hidrógeno entre las aminas primarias del quitosano y los grupos hidroxilo libres en el PEG. La muestra de PEG<sub>4000</sub>, no presenta la tendencia que exhiben sus homólogos, ya que el hinchamiento tanto en la etapa inicial como posterior a las 24 horas es mayor, demostrando que el entrecruzamiento no fue tan efectivo.

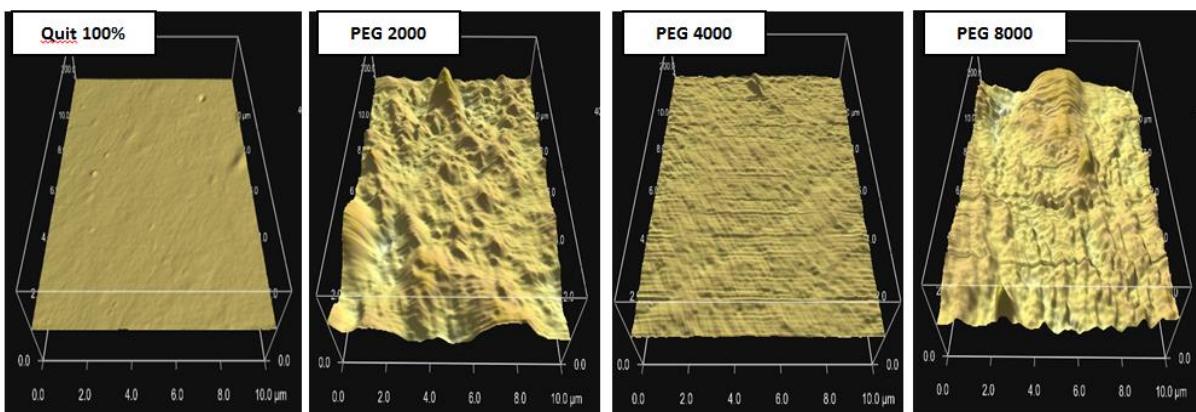


Figura 1. Micrografías obtenidas por AFM correspondientes al análisis morfológico de las películas entrecruzadas con polietilenglicol en función de su masa molecular.

En la figura 2 se presentan las micrografías obtenidas por AFM correspondientes al análisis morfológico de los hidrogeles, a partir de ellas se puede observar como el hidrogel de quitosano sin entrecruzar presenta una superficie totalmente lisa, para el caso de los hidrogeles modificados con PEG a diferentes masas moleculares, es evidente como la rugosidad superficial se ve incrementada para las muestras formuladas con PEG 2000 y 8000 Da, datos que concuerdan con las observaciones realizadas a través de los perfiles de hinchamiento de los biomateriales y fundamentan el fenómeno de entrecruzamiento físico atribuible a la interacción física QUIT-PEG.

Con base en los resultados obtenidos a partir del análisis físico de los hidrogeles de quitosano modificados con PEG de diferentes masas moleculares, se decide descartar los hidrogeles formulados con PEG<sub>400</sub> y dado a que no se encontraron diferencias estadísticamente significantes entre los hidrogeles formulados con PEG<sub>2000</sub> y PEG<sub>8000</sub>, se continua con ambos sistemas para los estudios de formulación.

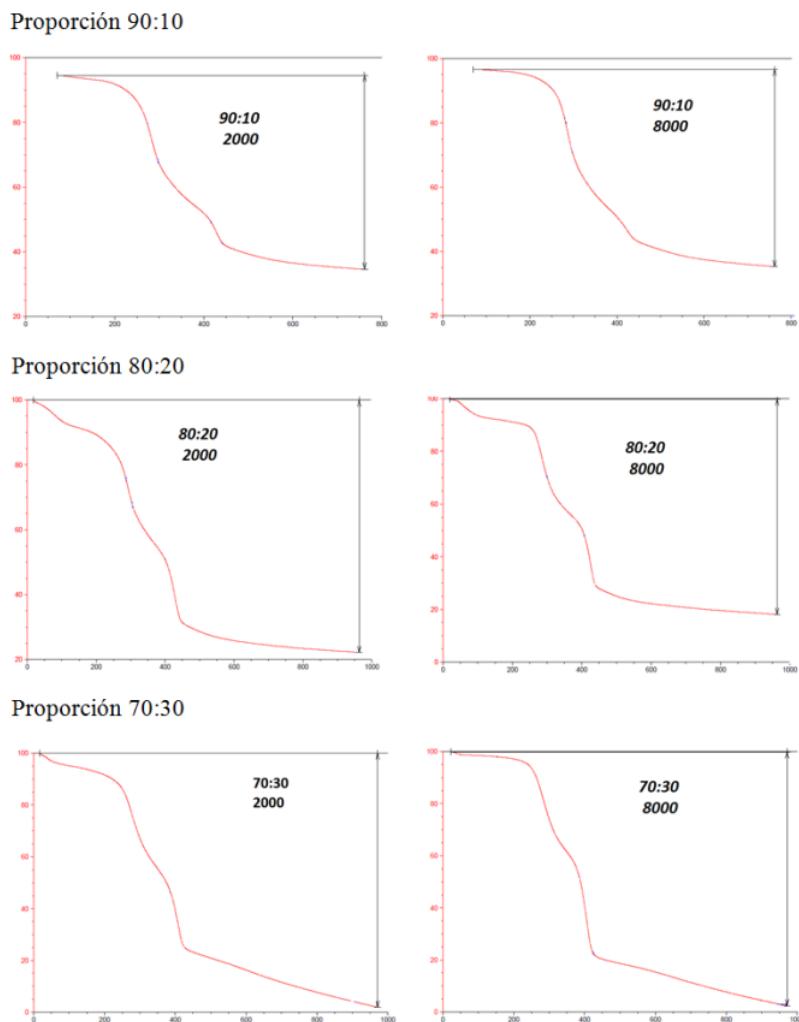


Figura 3. Termogramas obtenidos por termogravimetría para los diferentes hidrogeles conjugados QUIT:PEG, modificando proporciones y masa molecular del entrecruzante.

Para las diversas formulaciones se obtuvieron las curvas termogravimétricas, se observa que el primer evento térmico para todos los casos ocurre a temperatura inferior a 100 °C, mismo que estaría relacionado con la degradación térmica del polietilenglicol. Al aumentar la cantidad de entrecruzante en la matriz biopolimérica, la temperatura de degradación asociada a este evento va disminuyendo, este fenómeno puede atribuirse a un exceso de entrecruzante en la matriz, ya que una vez saturados los

grupos amino libres del quitosano, el PEG remanente permanecerá como moléculas libres atrapadas dentro de la matriz del hidrogel, estabilizadas por débiles fuerzas de interacción polar, el polietilenglicol posee un punto de fusión de 63 °C. El segundo evento térmico ocurre cerca de los 280 °C, donde se presenta una segunda degradación, este fenómeno está asociado con la degradación de la matriz polimérica del quitosano. No obstante, la adición del agente entrecruzante incrementa la temperatura de degradación de la matriz de quitosano, confiriéndole cierto grado de estabilidad térmica asociada a la densidad de entrecruzamiento de su red polimérica modificada. Finalmente, alrededor de los 420 °C se observa el tercer evento térmico, atribuible a las reacciones de descomposición y oxidación, correspondiente a la degradación del polietilenglicol inmerso en la red tridimensional del hidrogel en estudio. Se puede concluir que la proporción 90:10 QUIT:PEG es la formulación de mejor desempeño, debido a que presenta un grado de entrecruzamiento efectivo y sin restos libres de agente modificante.

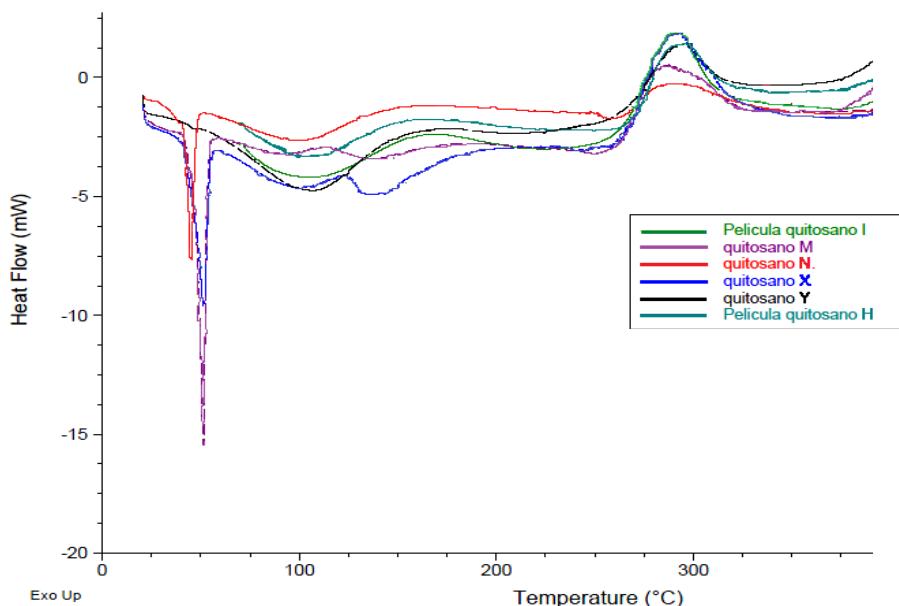


Figura 4. Termogramas por DSC para conjugados QUIT: PEG, modificando proporciones y masa molecular del plastificante: I) 90:10<sub>2000</sub>, H) 90:10<sub>8000</sub>, Y) 80:20<sub>2000</sub>, X) 80:20<sub>8000</sub>, M) 70:30<sub>2000</sub>, N) 70:30<sub>8000</sub>.

En la figura 4 se observan los termogramas de DSC obtenidos para los diversos hidrogeles, el primer evento corresponde a la entalpía de fusión del modificante adicionado, el cual se presenta dentro del rango de temperaturas de 40 °C a 100 °C y es evidente para los hidrogeles conjugados formulados con QUIT:PEG en proporciones 80:20 y 70:30, presentándose como una banda exotérmica estrecha de alta intensidad. El siguiente cambio térmico se lleva a cabo a temperaturas entre 200 °C y 250 °C, el cual

antecede un evento exotérmico y se presenta como una transición vítreo, atribuible a un reordenamiento a nivel molecular de las cadenas del polímero. El tercer evento térmico corresponde a una banda exotérmica característica del quitosano al alcanzar su temperatura de descomposición, y se presenta en el ámbito de temperaturas de 290 °C a 310°C, aproximadamente.

En general el entrecruzamiento es más efectivo con una cantidad menor de agente modificador, ya que conforme se incrementa el contenido de PEG en la matriz, se observa un incremento en la intensidad de la banda asociada a la temperatura de fusión del PEG indicando que hay exceso del material que no se ha entrecruzado.

La proporción 90:10 exhibe la primera transición endotérmica a una temperatura que supera en el doble a los otros conjugados, indicando que el entrecruzamiento ocurre efectivamente, proporcionando mejores propiedades térmicas al hidrogel ya que es más resistente a la degradación. De igual forma, no se observan diferencias significativas en las formulaciones de hidrogeles conjugados, en función de la masa molecular, para los sistemas preparados con PEG<sub>2000</sub> y PEG<sub>8000</sub>.

En el caso del conjugado 80:20 formulado con PEG<sub>8000</sub>, se observa una disminución significativa en la temperatura asociada a primera transición, que también se relaciona con un proceso de liberación de calor correspondiente a la entalpía de fusión del PEG, presentado por un pico endotérmico, el cual es más agudo que en los hidrogeles anteriores. Al ser una molécula de mayor tamaño (8000 Da) se reduce su probabilidad de entrecruzarse con las cadenas poliméricas del quitosano debido a la reducción de acceso a los grupos funcionales reactivos debido a un fenómeno de impedimento estérico, por lo que queda plastificante sin reaccionar y se observa un evento térmico a una temperatura tan cercana al punto de fusión teórico del PEG.

Analizando los hidrogeles con relación 70:30 de quitosano con PEG, se exhibe un comportamiento similar al descrito previamente, el cual evidencia una reducción en la efectividad del proceso de entrecruzamiento físico. En el termograma se observa un primer pico endotérmico muy agudo, con un ancho de banda menor al presentado por la relación 90:10 y que corresponde a la fusión del PEG que está en exceso. Así mismo, se observa la señal exotérmica ocasionada por la descomposición del quitosano, sin embargo esta se presenta a una mayor temperatura, indicando igualmente que el entrecruzamiento ocurrió de manera óptima.

Según los resultados de hinchamiento presentados en las figuras 5, se evidencia que conforme aumenta el grado de entrecruzamiento de los hidrogeles conjugados se observa un menor hinchamiento del biomaterial. El quitosano presente en la matriz del hidrogel, tiene la capacidad de absorber agua en su estructura, pero al comprometer sus grupos amino libres por la interacción con los grupos hidroxilo del

PEG, se reduce su potencial de absorción de agua y con ello el grado de hinchamiento de los hidrogeles. Por otra parte, al aumentar el porcentaje de agente modificador en la matriz del hidrogel, se observa un leve incremento en el grado de hinchamiento de las matrices y una mejora en las propiedades de manipulación de las mismas, puesto que las películas se vuelven menos frágiles y presentan mayor flexibilidad.

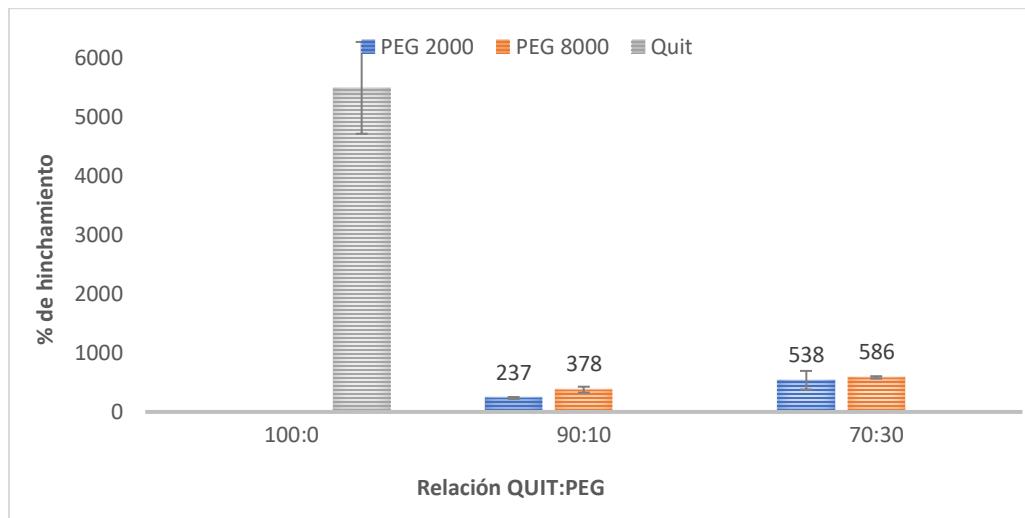


Figura 5. Porcentaje de hinchamiento máximo logrado por los hidrogeles híbridos QUIT:PEG

Este fenómeno puede estar asociado con la presencia de agente modificador en exceso, que presentaría un desempeño combinado en la matriz del hidrogel. Primero actuaría como agente entrecruzante a bajas concentraciones y una vez saturados los grupos amino libres, su presencia en exceso funcionará como plastificante o flexibilizante de la matriz, confiriéndole mejores propiedades mecánicas al hidrogel físico, lo que facilitaría su manipulación.

La información suministrada en la figura 5, permite evidenciar el éxito del proceso de entrecruzamiento físico de la matriz de quitosano con polietilenglicol. El porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles modificados con PEG mostró diferencias significativas estadísticamente ( $p<0,05$ ) en comparación con los hidrogeles de quitosano sin agente modificador. Sin embargo, también es evidente que las muestras formuladas con proporciones altas de PEG (70:30) mostraron un grado de hinchamiento significativamente superior ( $p<0,05$ ) al de las formulaciones de hidrogeles obtenidas con PEG en una relación (90:10). Los hidrogeles sin agente modificador tardan cerca de 200 minutos para alcanzar su grado máximo de hinchamiento. Sin embargo, los sistemas conjugados tardan cerca de 70 minutos en alcanzar dicho punto, ya que la capacidad de absorción de agua se ve reducida producto de la densidad de entrecruzamiento obtenida en la matriz respectiva, por lo tanto, requerirá menos tiempo para alcanzar su máximo hinchamiento, absorbiendo, igualmente, una menor cantidad de agua. La diferencia

observada para la matriz conjugada formulada con PEG (70:30) de masa molecular 8000, se fundamenta en los fenómenos estéricos, asociados al largo de la cadena polimérica, del agente modificante empleado. El largo de la cadena polimérica del PEG utilizado (8000 Da) y la baja accesibilidad a los grupos amino reactivos, libres en la cadena polimérica del quitosano, hace que la densidad del entrecruzamiento en esta matriz sea menor que la de su homólogo de masa molecular 2000 Da, por lo cual la capacidad de absorción de agua es mayor y le tomará más tiempo alcanzar su límite de saturación máxima al hinchartamiento.

En la tabla 1 se muestran los ángulos de contacto obtenidos a partir del análisis por goniometría de los hidrogeles híbridos QUIT:PEG.

Tabla 1. Ángulos de contacto (theta) obtenidos a partir del análisis por goniometría para los hidrogeles conjugados QUIT:PEG

	Relación QUIT:PEG		
PEG	100:0	90:10	70:30
2000 Da	102°	61°	69°
8000 Da		63°	93°

Los resultados obtenidos a partir del análisis goniométrico son coincidentes con las observaciones realizadas a partir de los ensayos físicos de hinchartamiento. En ellos se evidencia una reducción en el ángulo de contacto (theta), en función del incremento en el grado de entrecruzamiento de los hidrogeles híbridos. Se observa una diferencia entre las muestras formuladas con PEG (70:30) a diferentes masas moleculares, lo que refuerza la discusión relacionada con los fenómenos estéricos que reducen la densidad de entrecruzamiento en la matriz de PEG<sub>8000</sub> y por ello su incremento en el ángulo de contacto (theta) a 93°.

Por medio del microscopio de fuerza atómica se logra observar la superficie de los hidrogeles y evidenciar diferencias morfológicas en su superficie ocasionadas por la adición de agentes modificantes en su matriz, los cuales se presentan en la figura 7.

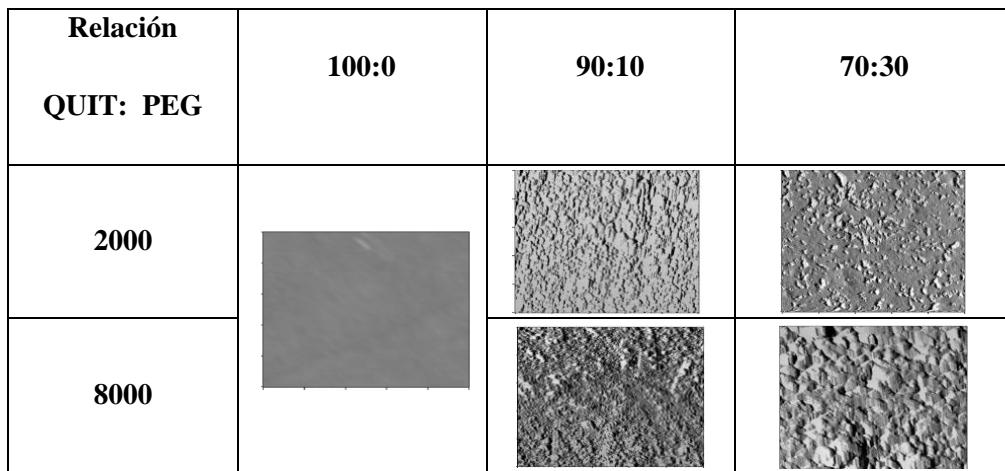


Figura 7. Micrografías AFM en 2D de hidrogeles poliméricos híbridos de QUIT:PEG formulados a diferentes proporciones de agente modificador en función de su masa molecular. Cada cuadrante representa 10x10  $\mu\text{m}$ .

El hidrogel formulado con quitosano puro presenta una superficie lisa y homogénea, mientras que queda evidente como la adición del PEG, utilizado como agente modificador de la matriz, produce un efecto entrecruzante en la misma, evidenciado por la marcada irregularidad de su superficie (rugosidad), que se relaciona con la pérdida de movilidad de las cadenas poliméricas luego de su entrecruzamiento físico. En el caso de la matriz formulada con PEG<sub>8000</sub> en proporción (70:30), nuevamente son evidentes las diferencias respecto a su comportamiento y apariencia superficial. En este caso, se observa una rugosidad menos homogénea a lo largo de la superficie analizada por AFM, lo que confirma la reducción en la densidad de entrecruzamiento de este sistema, producto de los fenómenos estéricos descritos en apartados anteriores y reforzados por las observaciones realizadas por ensayos físicos y térmicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos a partir del proceso de caracterización física y química de los hidrogeles poliméricos híbridos QUIT:PEG formulados mediante la modificación de sus proporciones de mezcla, se considera que la relación 90:10 es la relación óptima para desarrollar los hidrogeles entrecruzados físicamente con polietilenglicol como agente modificador de matriz, debido a que presentó mejores propiedades, además de su estabilidad y fácil manipulación.

Como última prueba se procedió a exponer muestras de hidrogeles híbridos de QUIT:PEG (90:10) a radiación ultravioleta durante diferentes intervalos de tiempo (2 horas y 5 horas), se evaluó el efecto generado por la luz ultravioleta en la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles híbridos QUIT:PEG (90:10), se encontró que no existen diferencias significativas entre las propiedades de hinchamiento de

los hidrogeles híbridos QUIT:PEG (90:10), sometidos a periodos de irradiación ultravioleta, a 30 Watts de potencia, hasta por un periodo de 5 horas. Esta observación es muy importante para asegurar que los hidrogeles mantendrán sus propiedades físicas, posterior al proceso de esterilización por irradiación.

Se analizaron los hidrogeles híbridos irradiados, para determinar algún cambio a nivel molecular producido luego del proceso de irradiación ultravioleta de los analitos seleccionados para este estudio y se concluye que no se presentan diferencias relevantes para el caso de los conjugados con diferente tiempo de exposición. Con el objetivo de evaluar la efectividad de la desinfección de los hidrogeles híbridos QUIT:PEG (90:10), se efectuó una siembra microbiológica de las muestras irradiadas durante dos horas.

Con base en los resultados obtenidos para el ensayo microbiológico, es apreciable como las muestras sin irradiar, presentan crecimiento de bacterias (indicado en recuento total), así como hongos y levaduras considerable, independientemente de que exista entrecruzamiento o no con PEG.

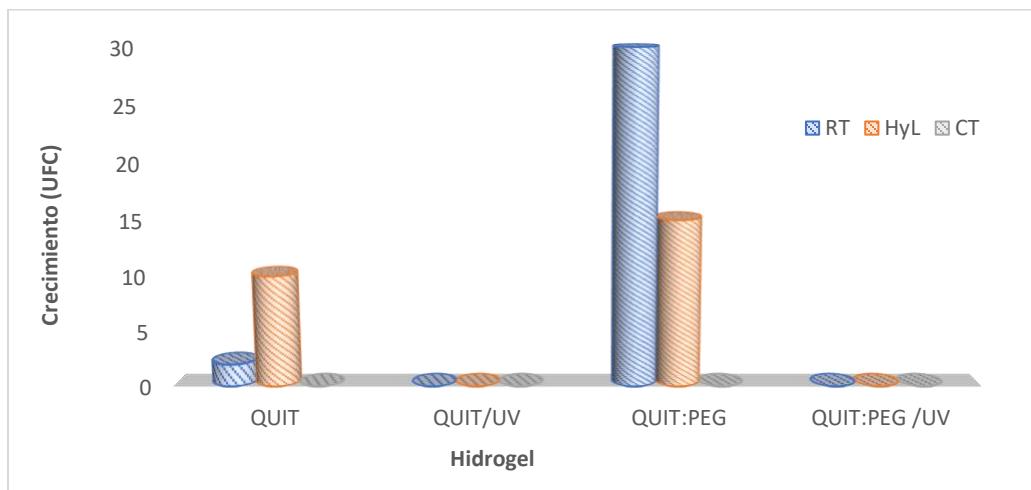


Figura 8. Resultados de la siembra microbiológica (RT: recuento total, HyL: hongos y levaduras, CT: Coliformes totales) para las muestras de hidrogeles híbridos QUIT:PEG (90:10), irradiadas con luz ultravioleta durante dos horas. QUIT: Hidrogel sólo de quitosano, QUIT/UV: hidrogel de quitosano irradiado, QUIT:PEG es el híbrido 90:10 PEG<sub>2000</sub> y QUIT:PEG /UV es el híbrido 90:10 PEG<sub>2000</sub> irradiado

Mientras que la efectividad en el proceso de desinfección con luz ultravioleta queda evidente en los hidrogeles irradiados, donde no se observan valores apreciables para las variables analizadas de recuento total de microorganismos (RT) y presencia de hongos y levaduras (HyL). Finalmente, en ninguno de los sistemas analizados, con y sin esterilización, se detectó crecimiento de coliformes fecales..

Los resultados generados con el estudio microbiológico permiten concluir que los sistemas híbridos QUIT:PEG formulados, mantienen sus propiedades físicas y químicas luego de ser sometidas a

procesos de esterilización estándar, por irradiación ultravioleta, y que dicho proceso permite reducir, prácticamente en un 100%, cualquier contaminación por microorganismos presentes en la matriz, garantizando su seguridad biológica para aplicaciones biomédicas.

#### 4. Conclusiones

Las pruebas de caracterización de los hidrogeles híbridos QUIT:PEG formulados, permiten comprobar la eficacia en el proceso de modificación de la matriz polimérica de quitosano mediante la adición de polietilenglicol. Se concluye que se genera un efecto entrecruzante de tipo físico, sobre la matriz polimérica bidimensional de los hidrogeles de quitosano, que conforme se adiciona entrecruzante a la matriz, el hidrogel se vuelve más estable al entrar en contacto con líquidos, esto demostrado por sus propiedades hidrofílicas, su capacidad de hinchamiento y menor degradación, comparado al hidrogel sin modificar. El sistema formulado con las proporciones 90:10, es el más adecuado para ensayos de aplicabilidad biomédica. Los ensayos de esterilización de las matrices híbridas QUIT:PEG (90:10) mediante procesos de irradiación ultravioleta a 30 watts de potencia, no presentaron ningún efecto significativo sobre las propiedades físicas y químicas del biomaterial, según se comprobó, este permitió eliminar de forma efectiva hasta un 100% del recuento total de microorganismos (RT) y la presencia de hongos y levaduras (HyL), esto ensayos permiten garantizar la seguridad biológica de esta matriz para eventuales aplicaciones en biomedicina.

#### 5. Bibliografía

1. Lizarbe, M. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat.*, 101, 247 (2007)
2. Carreira, A; Gonçalves, F; Mendonça, P; Gil, M; Coelho, J. *Carbohydrate Polymers.*, 47, 1 (2009)
3. Sánchez, A. Caracterización y utilización de hidrogeles de quitosano obtenidos a partir de camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) para el crecimiento de fibroblastos humanos. Tesis de bachillerato. Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica, 2006
4. Sánchez, A; Sibaja, M; Vega-Baudrit J; Madrigal, S. *Revista Iberoamericana de Polímeros.*, 8, 4, (2007)
5. Sánchez, A; Sibaja, M; Vega-Baudrit, J; Rojas, M. *Revista Iberoamericana de Polímeros.*, 9, 5, (2007)
6. Madrigal-Carballo, S; Porras, G; Sibaja, M; Vega-Baudrit, J; Vila, A.O; Molina, F. *Revista Iberoamericana de Polímeros.*, 11, 1, (2010)
7. Zamora-Mora, V; Ramos, M; Sibaja-Ballesteros, M; Vega-Baudrit, J. Editores G.C. Díaz y J.F. Gallardo, (España); Red Iberoamericana de Física y Química Ambiental, 2012. p. 308-357.
8. Alpizar-Vargas, L; Zúñiga-Montero, C; Rodríguez-Murillo, A; Vargas-Vásquez, A; Vega-Baudrit, J. *International Journal of Biosensors and Bioelectronics.*, 5, 3, (2019).
9. Soto-Cruz, J., Alvarado-Aguilar, P., Vega-Baudrit, J., Redondo-Gómez, C., Soto-Tellini, V., Madrigal-Carballo, S., Rojas-Carrillo, O., *UNICIENCIA.*, 32, 1, (2018)
10. Porras-Gómez, M; Vega-Baudrit, J; García, F; Pereira, R; Núñez-Corrales, S; Madrigal-Carballo, S. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology.*, 9, (2018)

11. Muzzarelli, R. Oxford (Inglaterra); Pergamon Press, 1973, p 254
12. Dong, Y; Qiu, W; Ruan, Y; Wu, Y; Wang, M; Xu, C. *Polymer Journal.*, 33, 387 (2001)
13. Hu, Y; Jiang, H; Xu, Ch; Wang, W; Zhu, K. *Carbohydrate Polymers.*, 61, 472 (2005)
14. Esquivel, M. Obtención de hidrogeles de quitosano a partir del Langostino *Pleuroncodes planipes*. Tesis de licenciatura. Heredia. Costa Rica. Universidad Nacional, 2005
15. Berger, J; Reist, M; Mayer, J; Felt, O; Peppas, N; Gurny, R. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.*, 57, 19 (2004)
16. Fernández, A; Janes, K; Csaba, N. Nanopartículas de quitosano y polietilenglicol como sistema de administración de moléculas biológicamente activas. *Organización Mundial de la Propiedad Intelectual*, 2006
17. Zentner, M; Jong-Seok, B; Feng, L. Mezclas de polímeros hinchables y deshinchables. *Oficina Española de Patentes y Marcas*, 2006
18. Ma, L; Gao, C; Mao, Z; Zhou, J; Shen, J; Hu, X; Han, C. *Biomaterials.*, 24, 4838 (2003)
19. Norma ASTM D 1005-02, *Standard Test Method for Measurement of Dry-Film Thickness of Organic Coatings Using Micrometers*, Filadelfia (USA): American Society for Testing and Materials, 2003
20. Norma ASTM D 1131-03, *Standard Test Method for compositional analysis by thermogravimetry*, Filadelfia (USA): American Society for Testing and Materials, 2003
21. Norma ASTM D 3418-99, *Standard Test Method for transition temperatures of polymers by differential scanning calorimetry*, Filadelfia (USA): American Society for Testing and Materials, 2003
22. Zamora-Mora, V; Sibaja, M; Vega-Baudrit, J. *Revista Iberoamericana de Polímeros.*, 11, 7, (2010)