



Trabajo de Fin de Máster

Uso de la Química Dinámica Covalente en la Síntesis de Biomateriales Funcionales

José Ignacio Hernández García

Tutores: David Díaz Díaz, Sebastián Bonarrrd

Curso 2021-2022



EL DR. DAVID DÍAZ DÍAZ, INVESTIGADOR DISTINGUIDO, Y EL DR. SEBASTIÁN BONARDD, INVESTIGADOR JUAN DE LA CIERVA-FORMACIÓN, ADSCRITOS AL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA,

AUTORIZAN:

La presentación del trabajo de Fin de Máster titulado "USO DE LA QUÍMICA DINÁMICA COVALENTE EN LA SÍNTESIS DE BIOMATERIALES FUNCIONALES", que ha sido desarrollado por D. José Ignacio Hernández García bajo nuestra dirección en los laboratorios situados en el Edificio Nanotec-ULL, ya que consideramos que reúne los requisitos para ser presentado y defendido ante el Tribunal designado al efecto.

La Laguna, a 6 de septiembre de 2022

Fdo. David Díaz Díaz

Fdo. Sebastián Bonardd

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 4761004 Código de verificación: kC2KnL/k

Firmado por: David Díaz Díaz
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 06/09/2022 07:46:35

Sebastian Bonardd Salvador
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

07/09/2022 00:44:04

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a todos los integrantes del grupo AFM-NANO tanto por sus enseñanzas como por el tiempo compartido. Gracias por su humor y por el buen ambiente que se genera gracias a todos. En especial agradecer a mis tutores, David Díaz Díaz y Sebastián Bonarrrd, los cuales me han ayudado a progresar tanto como químico como persona. Gracias por todo el tiempo pasado en el laboratorio, por los group meetings y las actividades de grupo, han hecho este último año inolvidable.

Agradecer a mi familia el apoyo incondicional en todo momento. A mis padres por estar siempre ahí en las buenas y en las malas. Son un pilar fundamental para mí en los momentos de flaqueza. A mi hermano, por ser como es y sacarme una sonrisa a diario. A mi pareja, que siempre me ayuda en todo lo que necesite, estando ahí cuando sea y donde sea, gracias.

Por último, me gustaría agradecer a mis compañeros de máster, ha sido un año intenso lleno de subidas y bajadas, pero ustedes lo han hecho mucho más llevadero. Sigán siendo como son y no cambien nunca. Muchas gracias.

“Rest at the end, not in the middle”

-Kobe Bryant

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la modificación de un biopolímero (quitosano) con grupos fenilborónicos para obtener un hidrogel que presentara la capacidad de autoregeneración. Se demostró de manera exitosa la modificación del quitosano resonancia magnética nuclear, espectroscopía infrarroja de reflectancia total atenuada con la transformada de Fourier. La estabilidad térmica del material fue estudiada mediante un análisis termogravimétrico, obteniéndose una temperatura de degradación térmica sobre los 245 °C. Se determinó la viscosidad del material en una disolución acuosa siendo su viscosidad intrínseca de 5,94. Se preparó un hidrogel de concentración 8 % (p/v) con capacidad de autoregeneración. Esta propiedad se probó mediante diferentes daños en el material. Se cuantificó la eficacia de curación mediante medidas de reología, obteniendo un 98% tras tres ciclos.

ABSTRACT

In the present work, the modification of a biopolymer (chitosan) with phenylboronic groups was carried out to obtain a hydrogel that has the self-healing capability. The modification of chitosan was successfully demonstrated by nuclear magnetic resonance, Fourier transform attenuated total reflectance infrared spectroscopy. The thermal stability of the material was studied by thermogravimetric analysis, obtaining a thermal degradation temperature over 245 °C. The viscosity of the material in an aqueous solution was determined with its intrinsic viscosity being 5.94. An 8% (w/v) concentration hydrogel with self-regeneration capacity was prepared. This has been tested qualitatively and quantitatively by means of different types of damages and techniques. Healing efficiency was quantified by rheology measurements, obtaining 98% after three cycles.

Índice

1.	Introducción	1
1.1	Tipos de química dinámica covalente	3
1.2	Mecanismos de autoregeneración	4
2.	Objetivos	8
3.	Parte experimental	8
3.1	Técnicas de caracterización	8
3.1.1	Resonancia magnética nuclear (RMN)	8
3.1.2	Espectroscopía infrarroja empleando reflectancia total atenuada por transformada de Fourier (ATR-FTIR)	9
3.1.3	Reología	9
3.1.4	Análisis termogravimétrico	9
3.1.5	Microscopía óptica	10
3.1.6	Viscosimetría	10
3.2	Determinación del grado de desacetilación del quitosano	10
3.3	Modificación química de quitosano con ácido fenilborónico	10
3.4	Preparación del hidrogel	11
3.5	Estudio de la propiedad de autoregeneración	11
4.	Discusión de resultados	12
4.1	Grado de desacetilación del quitosano	12
4.2	Síntesis y caracterización del CSPBA	14
4.2.1	Resonancia magnética nuclear	14
4.2.2	Análisis ATR-FTIR	16
4.2.3	Análisis térmico	19
4.3	Estudio de la viscosidad del quitosano modificado y sin modificar	22
4.4	Formación del hidrogel	26
4.5	Estudio de la propiedad de autoregeneración	27

4.6	Formación de películas y capacidad de autoregeneración	32
4.7	Obtención de un sistema híbrido entre dos biopolímeros	34
4.8	Estudio de las propiedades mecánicas del HG-80	35
5.	Conclusiones y perspectiva futura	40
6.	Bibliografía	40

-Glosario:

DCC: Química dinámica covalente (de sus siglas en inglés *Dynamic Covalent Chemistry*)

CDC: Química dinámica constitucional (de sus siglas en inglés *Constitutional Dynamic Chemistry*)

CS: Quitosano (Abreviatura de su nombre en inglés *Chitosan*)

PBA: Ácido fenilborónico (Siglas en inglés *Phenyl Boronic Acid*)

CSPBA-X: Quitosano modificado con ácido fenilborónico donde la X hace referencia al porcentaje de modificación

RMN: Resonancia magnética nuclear

ATR-FTIR: Espectroscopía infrarroja empleando reflectancia total atenuada con transformada de Fourier.

TGA: Análisis termogravimétrico

NHS: n-Hidroxisuccinimida

EDC: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

Peso/Volumen: p/v

$[\eta]$: Viscosidad intrínseca

η_{sp} : Viscosidad específica

η_{rel} : Viscosidad relativa

τ : Esfuerzo

γ : Deformación

δ : Ángulo de fase

G' : Módulo de almacenamiento o módulo elástico

G'' : Módulo de pérdidas o módulo viscoso

1. Introducción

La química dinámica covalente o DCC (por sus siglas en inglés *Dynamic Covalent Chemistry*), describe la formación de enlaces covalentes de naturaleza dinámica. Inicialmente, este tipo de reversibilidad era atribuida a interacciones supramoleculares en su mayoría, entre las que destacan los enlaces de hidrógeno. Estas interacciones supramoleculares fueron ampliamente estudiadas y aplicadas a diferentes tipos de materiales. Sin embargo, debido a la naturaleza del ensamblaje supramolecular, aquellos materiales que debían ser expuestos a un gran esfuerzo colapsaban con facilidad. Este hecho generó la necesidad de combinar las grandes propiedades que presentaban los materiales supramoleculares, con la robustez y estabilidad de los enlaces covalentes. Finalmente, la solución para este problema fue el desarrollo de la química dinámica covalente.^{1,2,3}

El concepto de la química dinámica covalente ha sido empleado desde los inicios de la química. De hecho, algunos de los principales precursores de esta química fueron Williamson, Schiff o Fischer, los cuales realizaron descubrimientos fundamentales para el desarrollo de la DCC. La DCC es una estrategia para elaborar conjuntos supramoleculares complejos tomando como base, bloques de construcción moleculares discretos.⁴ Se ha logrado el desarrollo de diversos ensamblajes complejos como estructuras orgánicas covalentes, nudos moleculares, polímeros y macrociclos.⁵ Es de suma importancia realizar la siguiente aclaración, la DCC hace referencia únicamente a las interacciones de enlace covalente. Este fenómeno se encuentra en estrecha relación con el comportamiento termodinámico del sistema. El equilibrio rápido permite que existan simultáneamente varias especies diferentes, entre las que se pueden seleccionar aquellas con las propiedades químicas, biológicas y farmacéuticas adecuadas. El equilibrio puede ser modificado mediante varios métodos, uno de ellos es la adición de una plantilla que produce un desplazamiento del equilibrio hacia la formación del complejo más estable, esto se ha denominado efecto pantalla termodinámica. Este nuevo equilibrio desplazado se retiene mediante la modificación de las condiciones de reacción. Otro de los conceptos más importantes en la DCC son los sistemas dinámicos. Estos sistemas son conjuntos de componentes moleculares que tienen la capacidad de ensamblarse y desensamblarse de manera reversible. Como se ha comentado

anteriormente, el control termodinámico del sistema es un aspecto clave en la DCC. El ensamblaje reversible genera productos e intermedios semiestables. El camino de reacción puede estar controlado por vías cinéticas o termodinámicas. Los intermedios de naturaleza cinética se alcanzan en un tiempo menor debido a que su energía de activación es notablemente inferior (Figura 1). Sin embargo, cuando este proceso se expande en el tiempo el sistema tiende a evolucionar hacia los productos termodinámicos, ya que se encuentran en un nivel menos energético. Esta fuerza que provoca la migración desde los productos cinéticos hacia los termodinámicos se denomina control termodinámico. El uso de plantillas termodinámicas permite disminuir la energía libre requerida para un producto. Un ejemplo de plantilla termodinámica es el ciclofano C2.

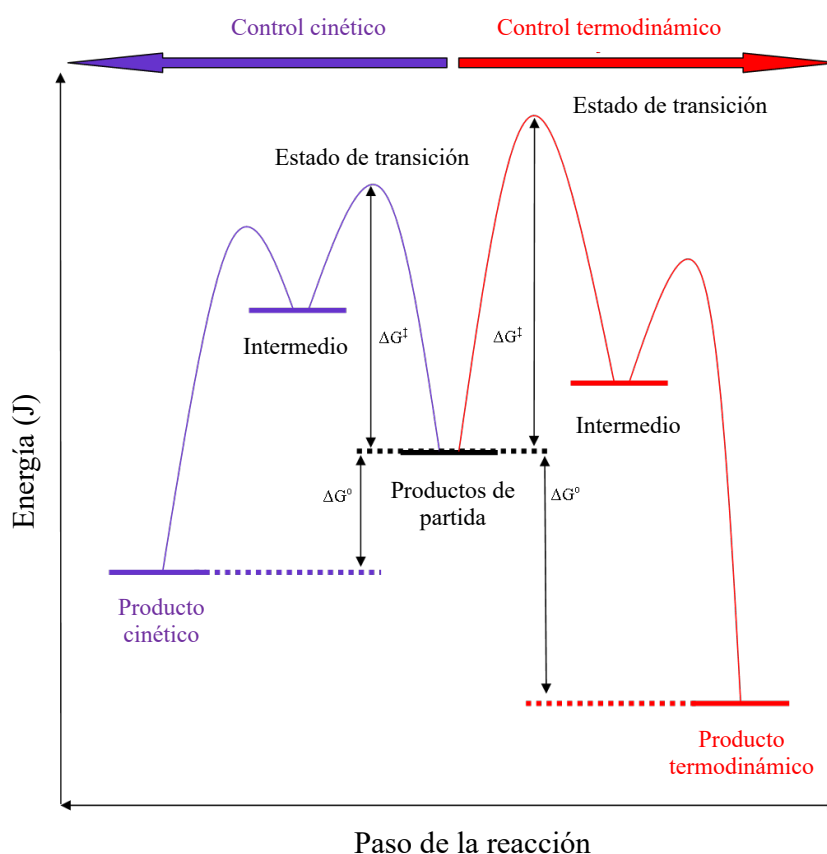


Figura 1. Diagrama de energía general en el que se muestran los dos caminos de reacción, el cinético (violeta) y el termodinámico (rojo). Imagen adaptada con permiso de https://hmong.es/wiki/Dynamic_covalent_chemistry.

La DCC se ha empleado en muchos campos de investigación, siendo uno de los más destacados el campo de los hidrogeles o materiales blandos. Cuando un hidrogel es formado mayoritariamente por interacciones dinámicas de tipo covalente puede presentar una propiedad denominada autoregeneración (mejor conocida por su nombre en inglés *self-healing*). Esta propiedad es de suma importancia, pues permite aumentar

considerablemente el tiempo de vida media de estos materiales blandos conservando sus propiedades mecánicas. A lo largo de esta introducción se detallará esta propiedad y su impacto en la ciencia de los materiales.

1.1 Tipos de química dinámica covalente

Generalmente, existen varios requisitos para que la DCC pueda llevarse a cabo. Al contrario que las interacciones supramoleculares, las cuales se basan en interacciones fundamentalmente débiles, la DCC debe lidiar con enlaces covalentes robustos y generalmente la cinética de formación es lenta. Debido a esto, existen varios factores que se deben tener en cuenta para plantear las posibles reacciones que se van a llevar a cabo. En primer lugar, se debe conocer el tiempo de vida media de los enlaces reversibles y estos deberían encontrarse en el rango de $1 \text{ ms} < \tau < 1 \text{ min}$, para asegurar que los enlaces dinámicos serán lo suficientemente estables para mantener una estructura molecular con comportamiento dinámico. Esta importancia del tiempo de vida media tiene un gran efecto en las propiedades de los sistemas, siendo las propiedades del mismo dependientes del tiempo. Por ejemplo, en química supramolecular, el tiempo de vida media de los enlaces de coordinación tiene un efecto directo en las propiedades mecánicas del material, siendo desde fluidos muy viscosos hasta sólidos elásticos resistentes. Como se ha comentado anteriormente, la cinética de formación de enlace es de suma importancia, por lo que se requiere que sea todo lo rápida que sea posible. Desde el punto de vista termodinámico, se requiere que el equilibrio sea más estable que la forma desplazada para mantener la naturaleza dinámica en el tiempo. Otro de los factores más importantes son las condiciones de reacción. Por lo general, se busca trabajar con condiciones de reacción suaves ya que permite emplear un mayor espectro de grupos funcionales. Se debe tener en mente la biocompatibilidad del medio, por lo que medios acuosos suelen ser altamente recomendados para este tipo de química. Por último, el sistema debe ser fácilmente desplazable hacia una de sus dos formas. Se han desarrollado numerosas estrategias para romper el equilibrio, entre ellas destacan los cambios de pH, cambios de temperatura, estímulo con luz de diversas longitudes de onda, etc.

Teniendo en cuenta los requisitos necesarios para obtener un sistema que se incluya en la DCC, se puede intuir con facilidad el amplio espectro de grupos funcionales y de mecanismos que pueden ser empleados (Figura 1). En este trabajo se hará hincapié en los

mecanismos químicos que habilitan la DCC. Principalmente se emplean dos tipos mecanismos químicos para obtener un sistema DCC, la reconstrucción de la red covalente mediante la interacción de grupos funcionales terminales y la reconstrucción de la red covalente mediante el empleo de radicales libres. Para obtener este tipo de sistemas, primero es necesario conocer que tipos de grupos funcionales (Figura 2) y reacciones dan lugar a enlaces covalentes dinámicos. Entre estos grupos funcionales se encuentran las iminas o bases de Schiff,^{6,7} los enlaces del tipo C-S⁸ o los ésteres de boronato.⁹ No solo son capaces de formar enlaces covalentes dinámicos los grupos funcionales, también los productos de ciertas reacciones tienen estas propiedades, la reacción más empleada en estos casos es la reacción de Diels-Alder.^{10,11,12}

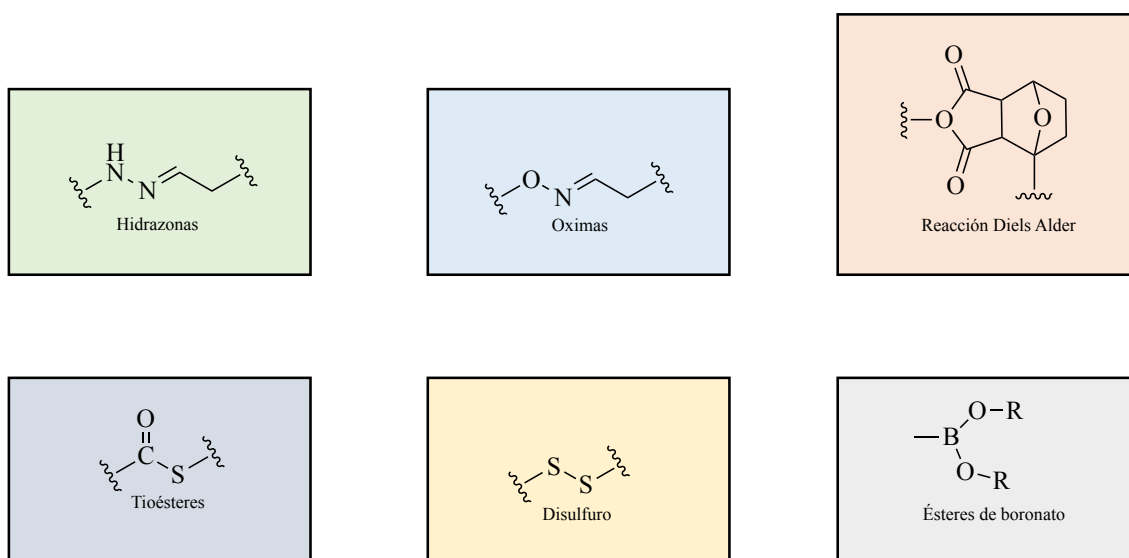


Figura 2. Ejemplos de diferentes enlaces covalentes dinámicos.

Los materiales que presentan este tipo de enlaces covalente dinámicos suelen poseer la propiedad de autoregeneración. Esta propiedad permite que el material en cuestión regenere el daño provocado en el mismo al ser sometido al estímulo que cataliza la formación de los enlaces covalentes.

1.2 Mecanismos de autoregeneración

Los mecanismos de autoregeneración se han subdividido principalmente en dos los mecanismos extrínsecos y los mecanismos intrínsecos. El mecanismo extrínseco se produce por acción de agentes externos al material, es decir, la estructura química del material se mantiene inalterada. El clásico sistema para este tipo de mecanismos consiste en la dispersión de dos microcápsulas en la superficie del material. Una de ellas contiene

el agente reparador, el cual es capaz de asociarse consigo mismo para dar sellar el daño. Estos agentes reparadores suelen requerir de catalizadores, los cuales están dispersos en otra microcápsula. Al ser dañado el material (Figura 3), se liberan los dos componentes que dan lugar a la reacción correspondiente, reparando la zona dañada.

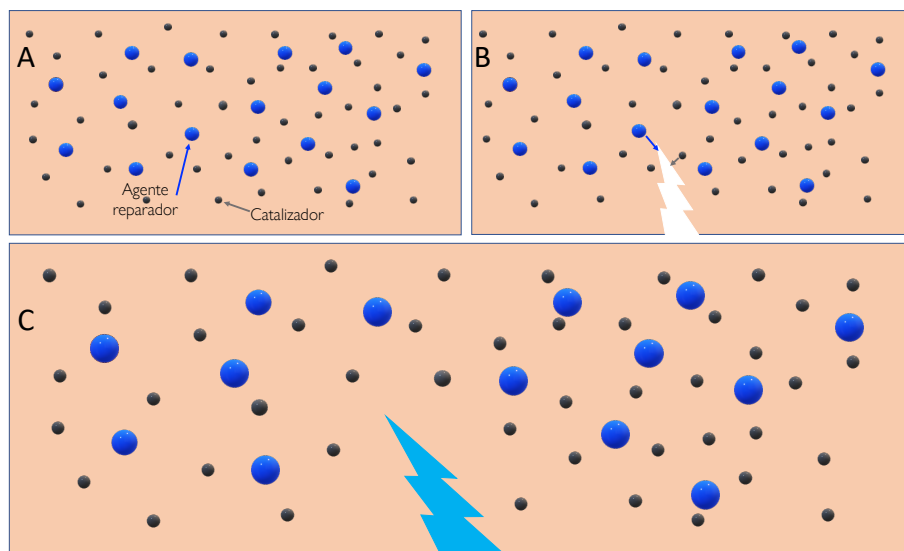


Figura 3. Diferentes etapas del mecanismo extrínseco de autoregeneración. A) Se muestra la situación inicial del material, en la que el agente reparador y el catalizador se encuentran dispersos en la matriz epoxi. B) se muestra el daño sufrido por el material y la liberación del agente reparador y el catalizador. C) Se muestra la completa recuperación del daño, debido a la acción del agente reparador. Ilustración realizada por José Ignacio.

Estos tipos de autoregeneración fueron ampliamente estudiados, ya que permitía aumentar considerablemente la vida útil de ciertos materiales. Uno de los principales ejemplos es la reparación de materiales epoxi dispersando en su superficie un ciclopentadieno y el catalizador de Grubbs de primera generación. El mecanismo por el que se logra sellar el daño causado en el material consiste en la polimerización por metátesis de olefinas (conocida por sus siglas en inglés *Ring-Opening Metathesis Polymerization*, ROMP).¹³ Sin embargo, actualmente se existe un mayor interés en los mecanismos de tipo intrínseco debido a las grandes propiedades que se logran atribuir al material.

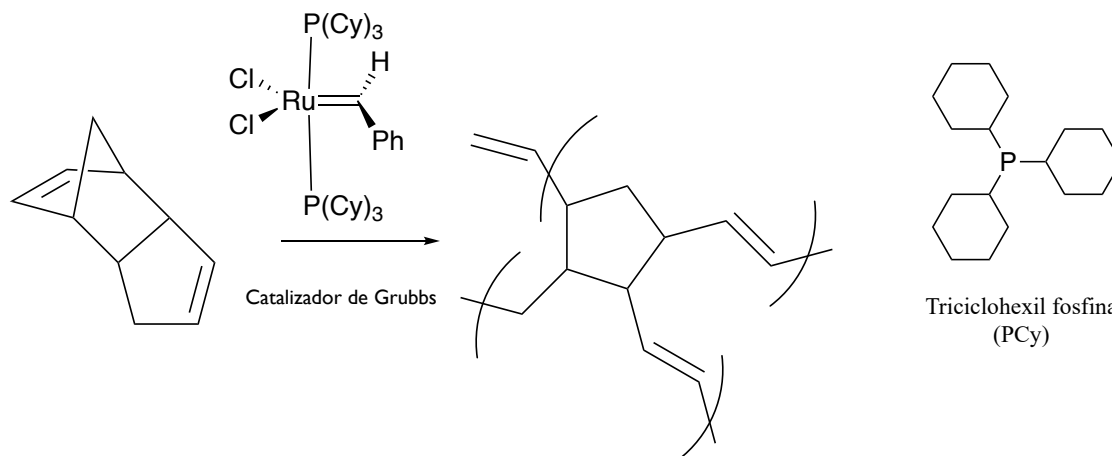


Figura 4. Ejemplo de la polimerización por metátesis de olefinas y estructura del catalizador de Grubbs de primera generación.

El mecanismo intrínseco se basa en la modificación de la estructura inicial del material para añadirle grupos funcionales con capacidad de formar enlaces covalentes dinámicos. Por lo general, este tipo de materiales deben ser sometidos a estímulos externos que catalicen la formación de enlaces covalentes. Existen numerosos estudios en los que se modifican tanto polímeros de origen sintético como biopolímeros. El principal objetivo de la autoregeneración intrínseca es la formación de una estructura covalente 3D que pueda dar lugar a un material suave, por ejemplo, a un hidrogel si se empleara el agua como disolvente. En base a esto, se han desarrollado multitud de sistemas haciendo uso de este tipo de grupos, como pueden ser los puentes disulfuro, iminas o ésteres de boronato. Las aplicaciones para este tipo de materiales son muy amplias, pues pueden ser usados como bioindicadores de glucosa como es el caso de los ésteres de boronato, como principal precursor del proceso de autoregeneración, permitiendo que el material conserve sus propiedades mecánicas inalteradas. Sin embargo, la principal aplicación que poseen muchos de estos materiales suaves se encuentran en el campo de la biomedicina y de la robótica. Debido a esto último, la modificación de polímeros naturales (Figura 5) como pueden ser el alginato, dextrano, quitosano, etc. ha atraído una gran atención en los últimos años.

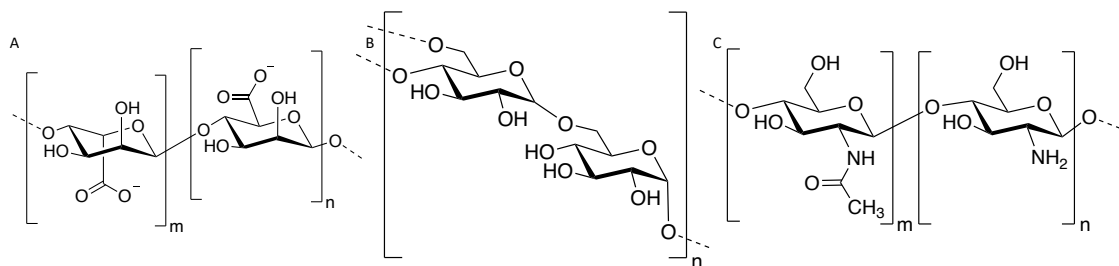


Figura 5. Estructuras de varios biopolímeros. A) Alginato, B) dextrano y C) quitosano.

Estos biopolímeros son seleccionados debido a la gran biocompatibilidad que suelen presentar, además de suponer una alternativa a los polímeros sintéticos, los cuales suelen requerir de disolventes mucho más tóxicos. La investigación en torno a los biopolímeros está en constante crecimiento debido a la necesidad de trabajar con sistemas sostenibles y poco agresivos con el medio ambiente. Entre los nombrados anteriormente, uno de los más estudiados es el alginato, este biopolímero esencialmente es un polisacárido con grupos carboxílicos en su estructura. Este material se extrae de las algas pardas, por lo que se extrae de una fuente puramente natural. Otra de las grandes ventajas de este biopolímero es su solubilidad en agua, siendo soluble en disoluciones acuosas con pH superior a 3,5. En cuanto a la aplicabilidad, principalmente se ha trabajado con la formación de hidrogeles de alginato, tratando de obtener un material con capacidad de autoregeneración. Estos sistemas hidrogeles se han planteado para diversas funciones como adhesivos, dosificadores de medicamentos, para componentes en robótica, para el tratamiento de heridas superficiales, etc.

En el año 2017, Díaz y colaboradores¹⁴ llevaron a cabo la modificación del alginato para incorporar grupos fenil borónico (desde ahora PBA, por sus siglas en inglés *phenylboronic acid*) a su estructura, haciendo uso de los grupos carboxílicos ya presentes en el mismo. Los PBA son capaces de formar ésteres de boronato, que permiten la formación de una red 3D dinámica covalente. Sin embargo, la metodología básica para afrontar este tipo de sistemas es el empleo de dos grupos, por un lado, el PBA que debe unirse al biopolímero deseado y por el otro lado, un grupo tipo catecol que permita la existencia de grupos hidroxilo en posiciones 1,2 o 1,3 respectivamente ya que favorecen la formación de estos ésteres de boronato. En el trabajo publicado por el grupo se planteó el empleo de los grupos hidroxilo, presentes en la estructura del alginato, para la formación de ésteres de boronato. Esto supone una simplificación en la metodología de trabajo, pues no se requiere de otra modificación más allá de la incorporación del grupo

PBA. Sin embargo, esto solo fue planteado para el alginato, por lo que se planteó la posibilidad de extrapolar estos resultados a diferentes biopolímeros, como el quitosano.

El quitosano es un aminopolisacárido cuyas unidades básicas son la β -(1,4) D-glucosamina y la *N*-acetil-D-glucosamina. Su estructura destaca por la presencia de grupos hidroxilos, así como de grupos aminos libres y acetilados. Este biopolímero es obtenido principalmente de la desacetilación de la quitina,¹⁵ la cual es extraída de diferentes crustáceos y de la pared celular de hongos y algas. El principal problema que presenta el quitosano es la insolubilidad en agua a pH relativamente básicos, sin embargo, al tratarse de un material biocompatible, biodegradable y no tóxico para el medio ambiente, suscita un gran interés en la comunidad científica. Debido a esto, se ha escogido el quitosano como pilar fundamental de este trabajo.

2. Objetivo

El objetivo general establecido para este trabajo es la obtención de un sistema hidrogel capaz de autoregenerarse y conservar sus propiedades mecánicas

Los objetivos específicos planteados para alcanzar el objetivo general fueron los siguientes:

- 1- Modificar el quitosano con ácido fenil borónico y caracterizar tanto el biopolímero modificado y sin modificar.
- 2- Demostrar la posibilidad de fabricar redes dinámicas covalentes empleando únicamente los grupos hidroxilo presentes en el biopolímero.
- 3- Obtener un hidrogel con propiedades mecánicas adecuadas y que presente la propiedad de autoregeneración.
- 4- Caracterizar la propiedad de autoregeneración mediante el uso de la reología y compararlo con otros materiales.

3. Parte experimental

Todos los reactivos y disolventes empleados en este trabajo fueron adquiridos a través de distribuidores comerciales y fueron usados sin tratamiento previo. Quitosano de medio peso molecular (CS, DS: 54,65 %), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato (EDC·HCl, 99,99 %) para síntesis, *N*-hidroxisuccinimida (NHS, 98,00 %), ácido acético glacial (AcOH, 99,99 %) y metanol (MeOH, 99,80 %) fueron comprados en

Sigma-Aldrich. Ácido 3-carboxifenilborónico (CPBA) fue adquirido en TCI Europe. Membranas de diálisis con un tamaño de corte de 3,5 kDa fueron obtenidos de Spectrum.

3.1 Técnicas de caracterización

3.1.1 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Las medidas de RMN de ^1H fueron realizadas en un equipo Bruker Avance 500 a temperatura ambiente. Los desplazamientos químicos se indican en partes por millón (ppm) usando como referencia la señal asignada para D_2O . La notación empleada para la multiplicidad de las señales obtenidas en los experimentos de RMN es la siguiente: s = singulete, d = doblete, t = triplete, q = cuartete, m = multiplete.

3.1.2 Espectroscopía infrarroja empelando reflectancia total atenuada por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros fueron realizados en un espectrómetro Cary 630 FTIR, los espectros se midieron realizando 50 barridos en un intervalo desde 4000 hasta 650 cm^{-1} . La resolución empleada en las mediciones fue de 2 cm^{-1} . El módulo de reflectancia total atenuada (ATR), permite conocer información de la muestra ya sea en estado sólido o líquido. Su funcionamiento se basa en la propiedad de reflexión interna total. El mecanismo se basa en la incisión de un haz de luz infrarroja en el cristal del ATR, el cual provoca que el haz se refleje una o más veces sobre la superficie de la muestra.

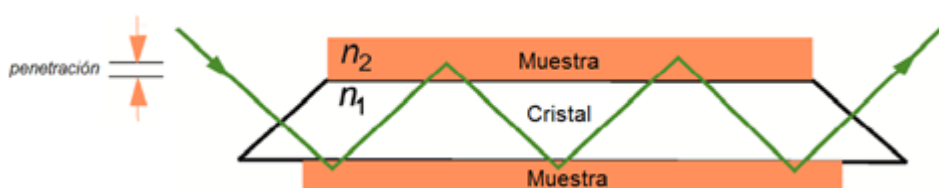


Figura 6. Funcionamiento del módulo ATR. Imagen adaptada de <https://triplenlace.com/2017/06/16/espectroscopia-infrarroja-de-reflexion-total-atenuada-atr/>

3.1.3 Reología

Para las medidas de reología se empleó un reómetro Discovery-HR2, equipado con un sistema de control de temperatura, un plato peltier que permite controlar la temperatura de la muestra. Los parámetros fijados para el estudio fueron $25\text{ }^\circ\text{C}$, intervalo de frecuencia de 0-100 Hz, sin aplicar ningún otro tipo de esfuerzo.

La reología permite conocer las propiedades mecánicas de todo tipo de hidrogeles, se basa en la aplicación de diferentes esfuerzos sobre el material, midiendo la respuesta de este. En este caso se ha realizado un esfuerzo de oscilación con una frecuencia variable. En este caso particular, se busca comprobar que el material mantiene un comportamiento viscoelástico a medida que aumenta la frecuencia. También se busca conocer los valores para G' y G'' , así como la capacidad de autoregeneración del material.

3.1.4 Análisis termogravimétrico

Los análisis mediante TGA fueron realizados en un TGA/SDTA851 Mettler-Toledo thermobalance. Los termogramas fueron realizados en un intervalo de 0 °C a 800 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

3.1.5 Microscopía óptica

Las medias de microscopía óptica fueron obtenidas mediante el uso de un microscopio óptico Motic B3 professional series, haciendo uso del aumento 4x, siendo este de 4/0.10. La muestra fue colocada sobre un portaobjetos de vidrio y cubierta con un cubreobjetos de vidrio.

3.1.6 Viscosimetría

Los estudios de viscosidad fueron llevados a cabo en un viscosímetro Ostwald. Para ello se hizo pasar en primer lugar la disolución sin polímero para determinar el tiempo que necesita el disolvente para recorrer dicha distancia. Los puntos deben ser medidos 5 veces para asegurar la mayor precisión posible, estos puntos se promedian para dar lugar a los valores de escurrimiento.

3.2 Determinación del grado de desacetilación del quitosano

En primer lugar, se preparó una disolución de quitosano siguiendo un procedimiento establecido:¹⁶ El quitosano (0,3 g) fue disuelto en una disolución 0,1 M de HCl (25 mL). Esta disolución se aforó a 100 mL y se disolvió KCl (0,75g) para ajustar la fuerza iónica a 0,1. Posteriormente, se valoró dicha disolución utilizando como agente valorante NaOH 0,05 M previamente estandarizada. Se empleó un pHmetro para monitorizar el valor de pH durante toda la valoración, dando por concluida la misma al alcanzar el valor de pH 12. Con estos datos se representó una gráfica pH vs V_{NaOH} , siendo V_{NaOH} el volumen de

NaOH empleado durante el procedimiento, para obtener los dos puntos de equivalencia del quitosano y con ello realizar el cálculo del grado de desacetilación.

3.3 Modificación química de quitosano con ácido fenilborónico

Con la intención de conocer si la introducción de estos grupos en la cadena de quitosano tiene un efecto significativo, se prepararon quitosanos modificados al 20, 60 y 90 %. La metodología empleada para realizar la modificación del CS es la propuesta por Juan Li et al, consistiendo en, disolver previamente el CS (1g, 3,93 mmol) en 120 mL de agua a la que se le añaden 360 μ L de ácido acético glacial, la disolución fue agitada por 24 horas para asegurar la correcta disolución del CS. Una vez transcurrido este tiempo, se disolvió el CPBA (651 mg, 3,93 mmol, cantidades variables para cada concentración) y el NHS (493 mg, 4,28 mmol) en 40 mL de metanol, la mezcla fue homogeneizada por 30 minutos. Seguidamente, se añadió el EDC·HCl (665 mg, 3,47 mmol) a la disolución de CPBA/NHS en un baño de agua-hielo para controlar la temperatura, la disolución se dejó bajo agitación constante durante 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo, se mezclaron ambas disoluciones en un baño de agua-hielo para controlar la temperatura. Se dejó bajo agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. La disolución fue dializada frente a agua cambiando el agua cada 30 minutos las primeras 24 horas, luego, los cambios se realizaron cada 3 horas por 2 días más. El dializado fue liofilizado durante dos días. Los materiales fueron denominados como CSPBA-20, CSPBA-60, CSPBA-90, dependiendo de la cantidad de ácido fenil borónico en la cadena de quitosano.

3.4 Preparación del hidrogel

Los hidrogeles de CSPBA fueron obtenidos mediante la preparación de 1 mL de una disolución acuosa de CSPBA (3 % peso/volumen), la cual se preparó en viales de 5 mL (dimensiones), a temperatura ambiente y bajo constante agitación durante 12 horas. Transcurrido ese tiempo se extrajo el hidrogel del vial y se depositó sobre una placa Petri (dimensiones) para ser incubado a temperatura ambiente.

3.5 Estudio de la propiedad de autoregeneración

La propiedad de autoregeneración fue estudiada a partir de distintos tipos de daño físico, inducidos mediante los siguientes experimentos:

- A) Daño punzante, provocando una apertura en el centro del material de aproximadamente 0,5 cm.
- B) Corte transversal resultando en la separación del material en dos partes

Posteriormente, para cada uno de los daños se dejó reposar el material durante un tiempo controlado. Para el daño B, se añadieron 100 μL de una disolución tampón a pH 8,15 en la interfase de las dos porciones del material. El tiempo máximo de duración para cada experimento fue de 1 hora.

4. Discusión de resultados

4.1 Grado de desacetilación del quitosano

El grado de desacetilación del quitosano es un parámetro sumamente importante y debe ser conocido antes de realizar los experimentos, pues indica el número de grupos $-\text{NH}_2$ libres en la macromolécula de quitosano. La ruta sintética elegida para la modificación se basa en la sustitución de estos grupos $-\text{NH}_2$ libres, por lo que se precisó del cálculo del grado de desacetilación para poder ajustar bien las cantidades de reacción. La valoración fue realizada mediante la metodología explicada en el apartado 3.3 obteniéndose los correspondientes valores de pH (Figura 7).

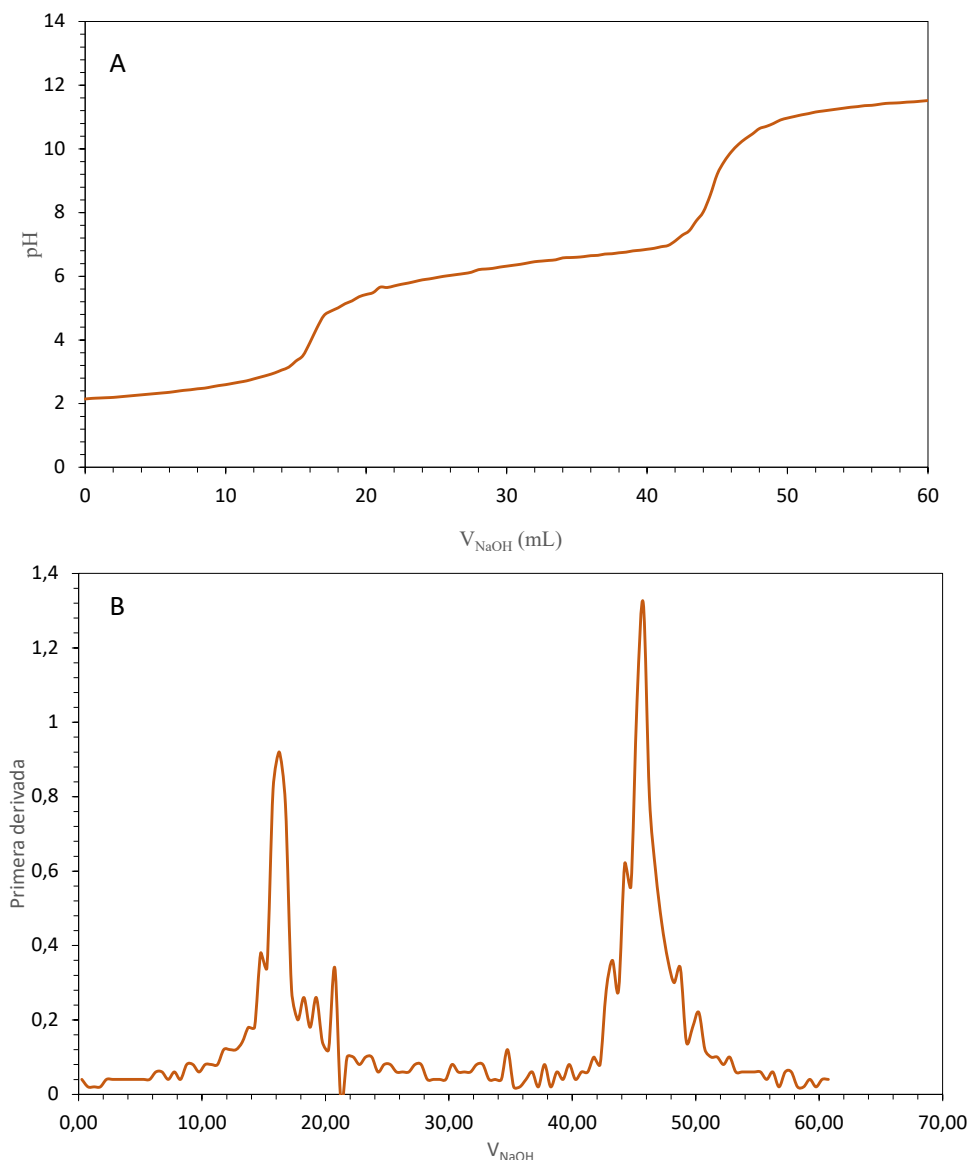


Figura 7. A) gráfica correspondiente a la representación de los valores obtenidos para la valoración del CS con NaOH. B) Primera derivada aplicada para la valoración del quitosano.

En la Figura 7, se puede observar claramente como la valoración presenta dos puntos de equivalencia, un primer punto de equivalencia se alcanza tras la adición de 16,5 mL de la disolución de NaOH, este punto corresponde con la neutralización del exceso de HCl presente en la disolución. El segundo punto de equivalencia es el de mayor interés, por ello se calculó su valor exacto aplicando la primera derivada. Se tomó como volumen inicial 25,0 mL, alcanzándose el volumen de equivalencia a un volumen de 46,0 mL. Para conocer con exactitud el volumen de NaOH necesario, se debe restar el valor obtenido para el punto de equivalencia, menos el volumen inicial, obteniéndose un valor de 21,0 mL. En base a este volumen se realizaron los siguientes cálculos para conocer el grado

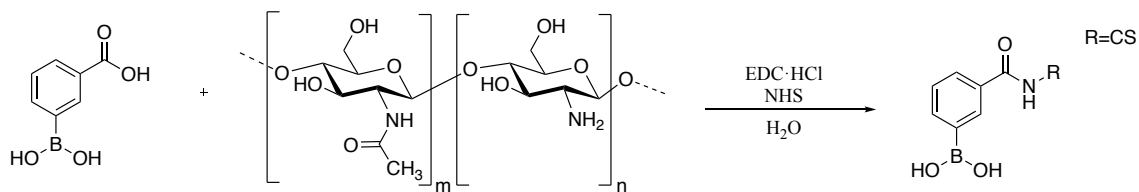
de desacetilación del quitosano empleado en la síntesis. El NaOH previamente estandarizado poseía una concentración de 0,048 M, por tanto, aplicando la siguiente ecuación:

$$V_{eq} \cdot M_{NaOH} = mmol \text{ quitosano}$$

El número de milimoles de quitosano obtenidos fue de 1,01. Si se multiplica este valor por la masa molar de una unidad de quitosano desacetilada (162 g/mol) se obtienen 0,163 gramos de unidades desacetiladas. Este valor indica la cantidad de CS disponible para llevar a cabo la reacción deseada. Para calcular el porcentaje de unidades desacetiladas en el quitosano, debe dividirse el valor de 0,163 g entre los gramos de CS iniciales, es decir, 0,3 g. Se puede concretar que el CS estudiado posee un grado de desacetilación del 54,65 %.

4.2 Síntesis y caracterización del CPBA

El acoplamiento por EDC se ha empleado durante muchos años^{17,18} debido a la sencillez experimental que supone. Sin embargo, existe un inconveniente para el caso particular que se plantea, el uso del agua como disolvente. La existencia de agua en el medio de reacción puede dar lugar a la aparición de reacciones secundarias no deseadas. Aún así, es necesario el uso de este disolvente por varios motivos, el primero es la poca solubilidad que presenta el CS en otros disolventes. El segundo es la toxicidad que exhiben la mayoría de disolventes orgánicos, es por esto que se decidió continuar con el agua como disolvente. El primer paso de esta síntesis es la formación de un intermedio entre el grupo carboxílico y el EDC, siendo sustituido posteriormente por el NHS, generando la urea. La urea formada por el EDC es soluble en agua, es por esto por lo que se seleccionó en lugar de su análogo el DCC, cuya urea no es soluble en agua. El segundo paso de la reacción consiste en el acoplamiento entre el grupo amino del CS y el intermedio nombrado anteriormente. El NHS actúa como buen grupo saliente, facilitando el posterior ataque nucleofílico de la amina proveniente del quitosano.

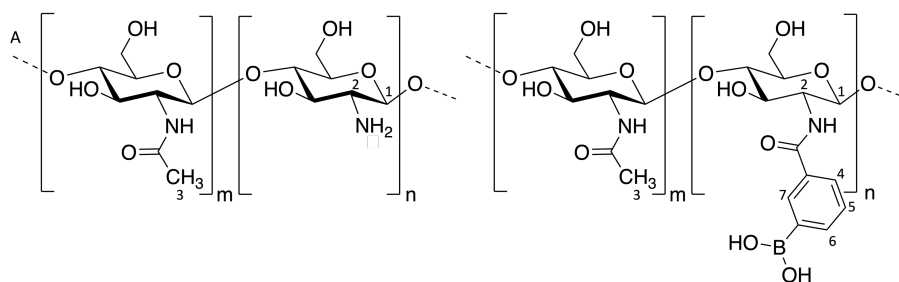


Esquema 1. Esquema en el que se describe la reacción de acoplamiento entre el ácido carboxílico del CPBA y el grupo amino del quitosano.

Se obtuvo un material esponjoso de color blanco, el cual fue caracterizado mediante diferentes técnicas que se describen a continuación.

4.2.1 Resonancia magnética nuclear

Los materiales fueron caracterizados mediante resonancia magnética nuclear, para una mejor asignación de las señales se decidió asignar la siguiente notación para CS y CSPBA-X.



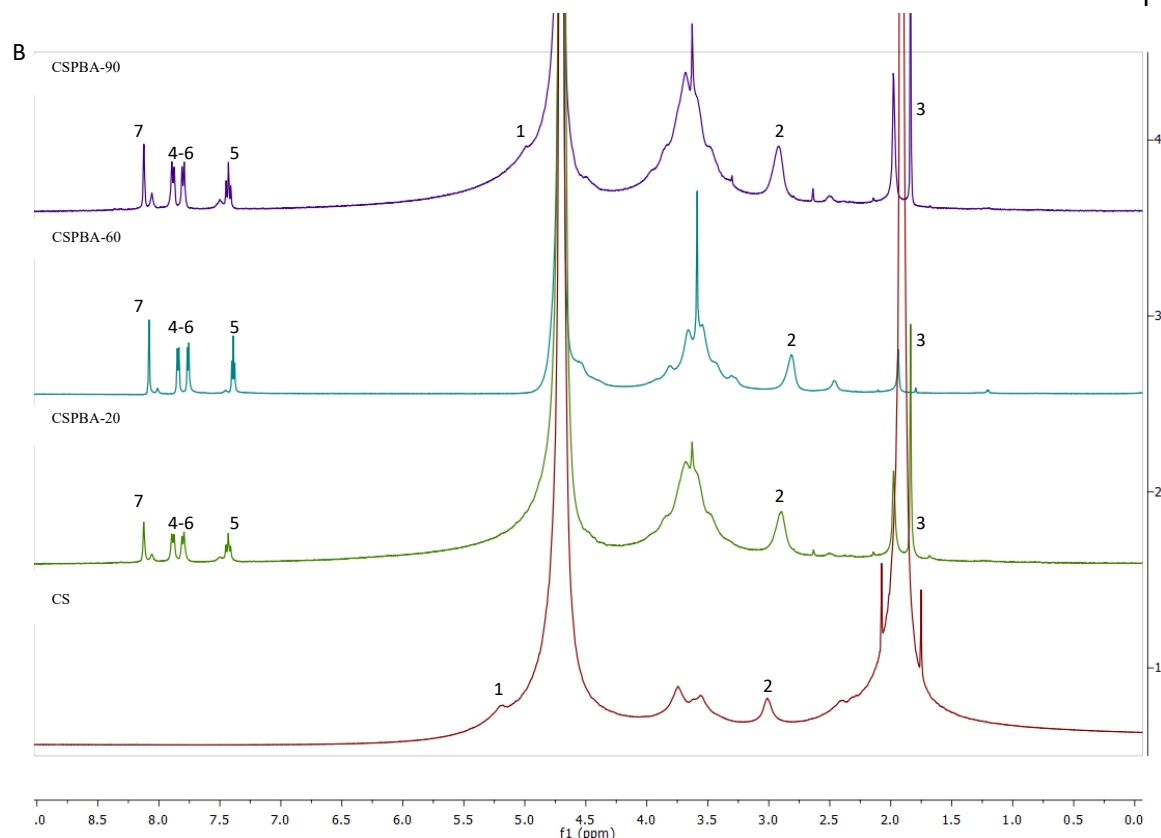


Figura 8. A) Notación de los hidrógenos presentes en las estructuras del CS (izquierda) y CSPBA (derecha). B) Espectros ^1H -RMN para el CSPBA-90, CSPBA-60, CSPBA-20 y CS.

En la Figura 8, se puede observar el ^1H -RMN realizado en D_2O como disolvente, su pico característico es fijado a 4,70 ppm y será empleado como referencia. En primer lugar, se debe destacar la aparición de 4 señales en los CSPBA (señales 4, 5, 6, 7),¹⁹ correspondientes a los hidrógenos del anillo aromático. La aparición de estos es un claro indicativo de la incorporación de los ácidos fenil borónicos a la cadena de quitosano. El siguiente pico que debería asociarse es aquel que aparece entorno a 5-5,3 ppm (señal 1),²⁰ pues corresponde con el hidrógeno unido al carbono anomérico de la unidad de quitosano. Se denomina carbono anomérico a aquel que se encuentra unido al oxígeno perteneciente al enlace glicosídico, que une las diferentes unidades de piranosa. Esta señal queda completamente solapada por la señal del disolvente, por ello no aparece en el espectro del CSPBA-20. En el intervalo entre 4-3,5 ppm se encuentran las señales correspondientes al esqueleto del quitosano, manteniéndose similares en los diferentes espectros. En 3,0 ppm (señal 2), se hace notable una señal única, la cual corresponde con el hidrógeno que se encuentra presente en el carbono unido al grupo $-\text{NH}_2$ o su forma acetilada. Finalmente, se debe destacar la presencia de una señal intensa entorno a 1,90 (señal 3) ppm,²¹ siendo esta la correspondiente al grupo $-\text{CH}_3$ en las unidades de quitosano acetiladas. Esta señal

será tomada como referencia para conocer el porcentaje de sustitución de los diferentes quitosanos. El grado de sustitución de los diferentes quitosanos fue realizado mediante la relación entre el área de pico de las señales aromáticas, en comparación con los hidrógenos presentes en el metilo. En base a esto, se determinó que los grados de sustitución fueron del 92 %, 63 % y 25 %.

4.2.2 Análisis mediante ATR-FTIR

El análisis infrarrojo se realizó mediante el empleo del módulo ATR permitiendo un análisis directo de la muestra, con esta técnica se quería comprobar posibles cambios en las bandas del quitosano debido a la incorporación de estructuras aromáticas a la cadena polimérica. Se realizaron medidas para los tres quitosanos obteniendo lo siguiente:

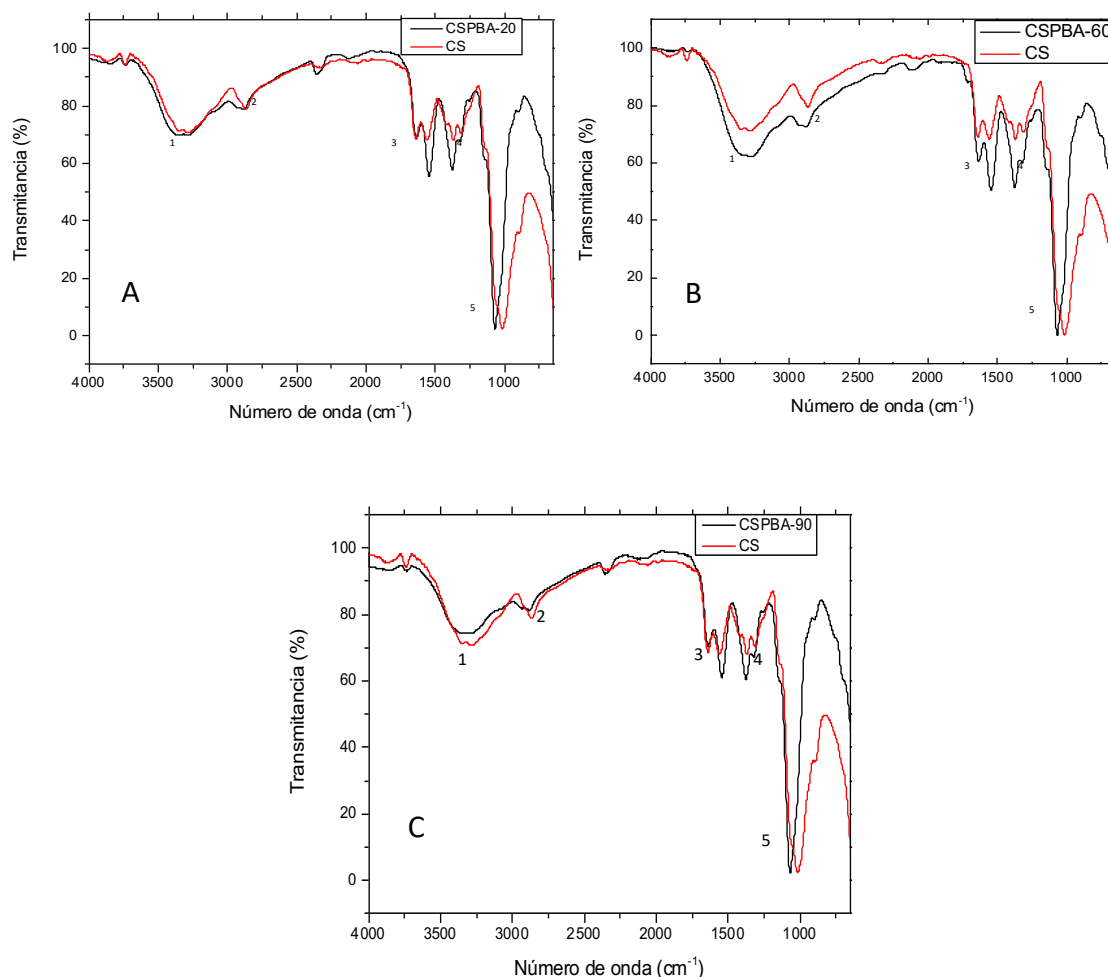
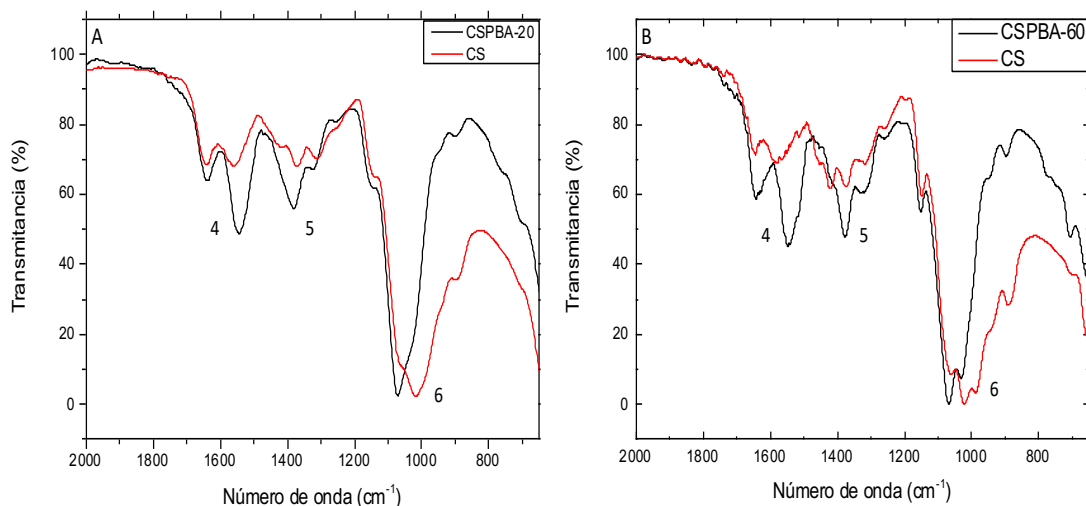


Figura 9. Espectros infrarrojos realizados mediante la técnica ATR-FTIR en el intervalo de 4000-650 cm^{-1} . A) Espectro para el CSPBA-20 comparado con el CS. B) Espectro para el CSPBA-60 comparado con el CS. C) Espectro para el CSPBA-90 comparado con el CS.

En la Figura 9, se pueden observar los espectros correspondientes al quitosano sin modificar (color rojo), superpuesto con los diferentes quitosanos con diferente grado de sustitución (color negro). Dichos espectros se encuentran realizados en el intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} . Se pueden observar varios picos característicos comunes en los tres quitosanos. En primer lugar, se puede observar un pico entorno a 3600 cm^{-1} , éste se asocia comúnmente a los grupos hidroxilos que no poseen la capacidad de formar enlaces de hidrógeno.²² La desaparición de este pico indica que dichos alcoholes que no se encontraban disponibles en el CS sin modificar, han sido activados tras la modificación del mismo. Avanzando en el espectro, aparece otra señal muy característica entorno a 3500-3000 cm^{-1} correspondiéndose con los grupos hidroxilo que poseen la capacidad de formar enlaces de hidrógeno. En la zona de 2800 cm^{-1} aparecen dos picos muy próximos que corresponden a la tensión simétrica y asimétrica de los enlaces CH y CH₂ presentes en la estructura de quitosano. Es importante destacar que, hasta ahora, ninguna de las señales mencionadas anteriormente ha sufrido modificaciones respecto a las presentes en el CS sin modificar. Para poder estudiar el intervalo del espectro comprendido entre 2000 y 650 cm^{-1} , se registraron espectros para cada uno de los materiales. Los espectros obtenidos se muestran a continuación:



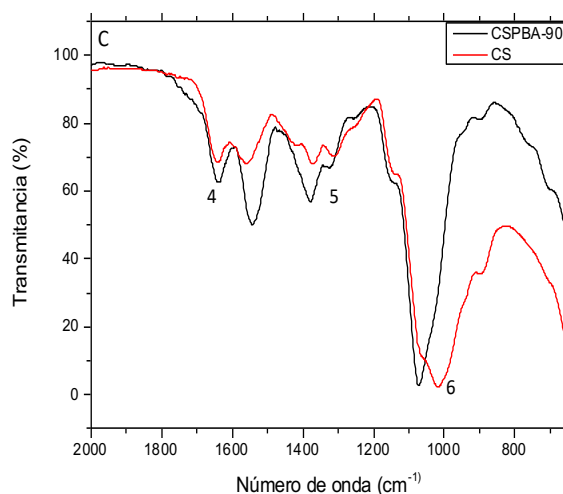


Figura 10. Espectros infrarrojos en el intervalo entre 2000-650 cm^{-1} . A) Espectro correspondiente a CSPBA-20. B) Espectro correspondiente a CSPBA-60. C) Espectro correspondiente a CSPBA-90.

Tras la obtención de dichos espectros (Figura 10), se observaron notables cambios entre los CSPBA y el CS sin modificar. En primer lugar, las señales denominadas como 4 y 5 corresponden a la amida formada. La señal 4 se asocia con la conocida amida I, la cual aparece entorno a los 1700 cm^{-1} . Esta señal es comúnmente atribuida a la tensión del enlace $\text{C}=\text{O}$ y a la contribución de la tensión del enlace $\text{C}-\text{N}$, dando lugar a la aparición de los dos picos que se pueden observar. La señal número 5 corresponde con la amida II, en este caso aparecer entorno a $1510\text{-}1580 \text{ cm}^{-1}$ y es consecuencia de la flexión del enlace $\text{N}-\text{H}$ mayoritariamente.^{23,24} La amida I y amida II se ven claramente más definidas que en el CS, esto puede deberse al aumento de la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas del CS, recordemos que, la señal asociada a los hidroxilos que no se encontraban disponibles para formar enlaces de hidrógeno desaparece en los CSPBA. Finalmente, la señal número 6 es la más notoria del espectro, esta corresponde a la tensión del anillo de piranosa presente en el quitosano.^{25,26} Llama la atención el cambio que sucede al realizar la modificación del CS, pues, esta señal se acentúa y se desplaza hacia números de onda más grandes por lo que se puede determinar que la tensión del anillo de piranosa está sufriendo un aumento energético. Este aumento energético puede deberse a la incorporación de los grupos fenilborónico, debido a la incorporación de un anillo aromático al esqueleto del quitosano, se produce un aumento de tensión y por consecuencia un aumento energético.

4.2.3 Análisis térmico.

Tras realizar las caracterizaciones mediante RMN y ATR-FTIR, se decidió continuar la caracterización únicamente con el CSPBA-90, ya que no existen diferencias significativas entre los diferentes CS. El análisis térmico se realizó para comprobar si existe alguna variación en las propiedades térmicas del material, como puede ser la descomposición térmica o el contenido de agua en el material. Se decidió realizar análisis TGA al CS sin modificar, al CSPBA-90 y al hidrogel formado con este material. El experimento se realizó calentando desde temperatura ambiente hasta 800 grados con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Tras ello se obtuvo lo siguiente:

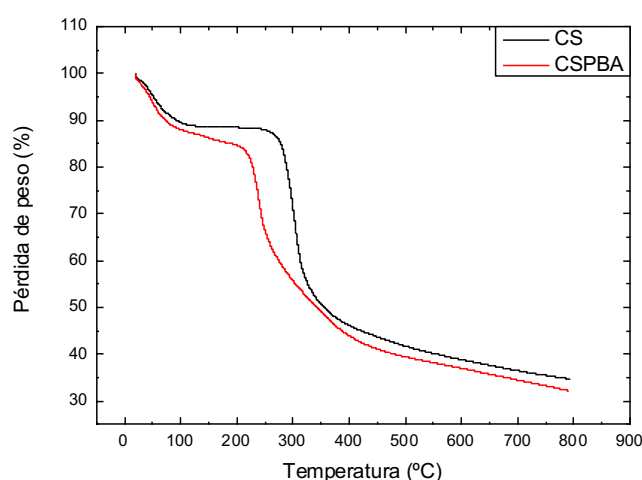


Figura 11. Curva obtenida para el análisis térmico para el CS y CSPBA.

El espectro mostrado (Figura 11), corresponde a la comparación entre el CS sin modificar y el CSPBA. En dicho espectro, se puede observar una clara pérdida de aproximadamente el 10 % de la masa hasta los 100 °C, esto se puede asociar a la pérdida de agua presente en el material. En el rango de temperatura entre 200-350 °C se produce la pérdida de masa más significativa, la cual puede ser atribuida a la descomposición del CS tal y como esta descrito en la bibliografía.^{27,28} De igual manera, se realizó la derivada de la curva TGA, denominada DTGA, para obtener el máximo de degradación térmica y poder comparar los procesos de degradación con más exactitud.

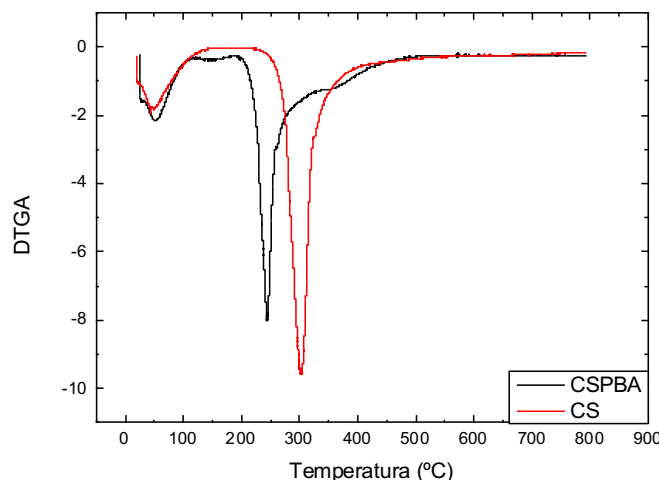


Figura 12. Primera derivada de la curva TGA para el CSPBA y el CS donde se muestra el máximo de degradación térmica.

Al realizar la DTGA y representarla frente a la temperatura, se obtienen los máximos de degradación térmica para cada material. Nótese la clara diferencia entre los procesos térmicos para la descomposición de la cadena de quitosano. Una vez realizado el análisis por TGA y su derivada, se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 1. Valores extraídos de los estudios TGA, DTGA para cada una de las muestras.

Muestra	T ₅ (°C)	TMD (°C)	TR (°C)
CSPBA-90	50,73	245,78	793,46
CS	51,72	302,60	793,96
Hidrogel	50,38	114,21	792,73

En la Tabla 1 se muestran tres valores diferentes obtenidos para cada material. En primer lugar, se encuentra la T₅ la cual indica la temperatura a la que el material ha perdido un 5 % de su masa. Este valor permite comparar la capacidad de pérdida de agua que tiene el material. En este caso, no existe una gran diferencia entre los valores obtenidos, produciéndose una variación de tan solo el 1,91 %. El siguiente parámetro determinado es la temperatura de máxima degradación, TMD, este valor indica la temperatura de máxima velocidad de degradación. Para ambos materiales, este máximo es alcanzado en el proceso de descomposición de la cadena de quitosano. La TR corresponde a la temperatura residual a la que termina el proceso térmico. Los valores obtenidos difieren de manera significativa entre ellos, suponiendo un cambio del 18,78 %. Teniendo en cuenta que para el CSPBA-90 se obtiene una temperatura inferior, se puede afirmar que

al agregar el grupo fenilborónico se está produciendo una mayor degradación térmica del quitosano. Esta hipótesis se sustenta en conjunción con los análisis ATR-FTIR, ya explicados en el apartado 4.3.2 donde se producía un desplazamiento de la señal correspondiente al anillo de piranosa a valores más energéticos. Este aumento de la tensión puede estar debilitando la estructura del quitosano, traduciéndose en una mayor degradación térmica.

Ya que el material CSPBA-90 es capaz de formar hidrogeles, se decidió realizar el estudio termogravimétrico para él, para comprobar si la introducción de agua en la matriz poseía algún efecto notable.

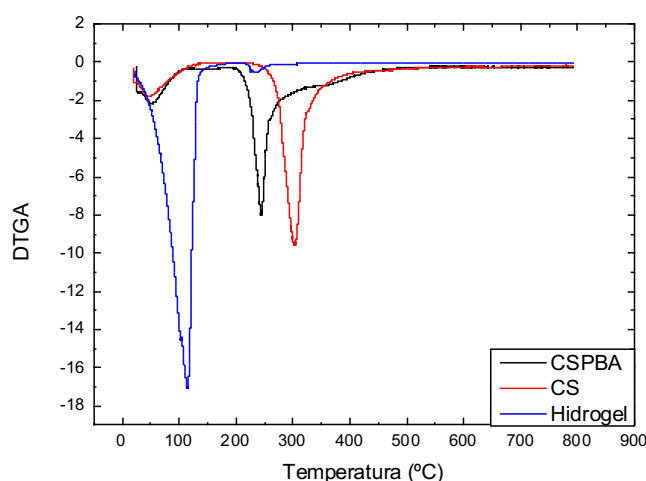


Figura 13. Representación de la DTGA para el CS, CSPBA y hidrogel.

Realizando el estudio de la DTGA (Figura 12) y comparando con los materiales comentados anteriormente, se ha comprobado que el proceso predominante en el hidrogel es la pérdida de agua. Sin embargo, se observa un proceso térmico, mucho menos pronunciado, en temperaturas próximas a la TMD del CSPBA-90, lo que indica que la tensión del anillo de piranosa no se ve alterada al formar el hidrogel (Tabla 1).

En términos de la T_5 se puede observar que el proceso de pérdida de agua es bastante similar al mostrado por el CSPBA-90, en este caso, el máximo de degradación térmica se muestra en el proceso de pérdida de agua. Este comportamiento era el esperado, ya que los hidrogeles son en su mayoría agua que se encuentra atrapada en la red polimérica. Como la cantidad de polímero presente en el material no es muy elevada, el proceso de descomposición del quitosano prácticamente no se aprecia.

4.3 Estudio de la viscosidad del quitosano modificado y sin modificar

En la química de polímeros el peso molecular de los materiales juega un papel crucial, condicionando su comportamiento tanto en el estado sólido como en disolución. Particularmente, mediante medidas de viscosidad de disoluciones poliméricas se puede obtener información importante acerca de su peso molecular, dimensiones e incluso calidad termodinámica del disolvente. En este trabajo utilizamos medidas de viscosidad con el objetivo de conocer el comportamiento del CSPBA y compararlo con el CS en una disolución acuosa. Estas medidas de viscosidad se realizaron empleando un viscosímetro Ostwald, el cual permite medir tiempos de escurrimiento para las soluciones de polímeros. Estos valores de tiempo son de suma importancia, pues permiten conocer la viscosidad relativa de cada material. Para entender mejor cómo funciona este instrumento, hay que comentar brevemente varios conceptos de las teorías de Kraemer y Huggings.²⁹ Las ecuaciones de Kraemer y Huggins, permiten calcular la viscosidad intrínseca de cada material, siendo dichas ecuaciones las siguientes.

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + K_H[\eta]^2 c \quad 1.1$$

$$\ln \left(\frac{\eta_r}{c} \right) = [\eta] + K_K[\eta]^2 c \quad 1.2$$

Siendo la 1.1 la ecuación de Huggings y la 1.2 la ecuación de Kraemer. Como se puede observar, se describen diferentes parámetros en la ecuación, siendo los más relevantes η_r , correspondiente a la reducida, $[\eta]$ correspondiente a la viscosidad intrínseca y C correspondiente a la concentración del polímero en disolución (g/dL). Es de suma importancia conocer estas ecuaciones, pues son las que permiten relacionar los datos obtenidos con el viscosímetro con la viscosidad intrínseca del material. Cabe destacar que, aunque no se conozca el peso molecular exacto del material, a través de la viscosidad intrínseca se puede estimar la dimensión de la cadena de polímero en el disolvente y, además, se puede obtener información relevante acerca de la calidad del disolvente.

En primer lugar, se debe conocer el tiempo que tarda el solvente solo en fluir entre los dos puntos señalados en el viscosímetro. En este caso se empleó como solvente una disolución acuosa de ácido acético 0,25 M y acetato sódico 0,25 M. El tiempo requerido

para el blanco fue de 49 segundos. Una vez conocido este tiempo, se procedió con la medida de tiempos para la disolución de CS y de CSPBA-90. Es importante conocer la viscosidad correspondiente al CS, ya que, una modificación en la misma podría dar información de cómo influye la modificación en la interacción de las cadenas de polímero con el disolvente. En primer lugar, se realizaron las medidas para el CS, para ello, se fijó una concentración inicial de polímero de 0,1 g/dL. Esta concentración se fue diluyendo para obtener 6 puntos diferentes con los que poder obtener los datos necesarios. Es importante destacar que las medidas de tiempo fueron realizadas por quintuplicado para minimizar los posibles errores experimentales. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 2. Concentración perteneciente a la disolución de polímero frente al tiempo de escurrimiento obtenido.

Concentración (g/dL)	Tiempo (s)
0,2	151
0,16	124
0,12	101
0,08	81
0,04	63

Una vez conocidos estos valores, se pueden deducir diferentes parámetros en base a las ecuaciones descritas con anterioridad. En primer lugar, se puede calcular la η_{rel} , que indica la relación entre el tiempo requerido por el polímero y el tiempo requerido por el blanco.

$$\eta_{rel} = \frac{t_p}{t_b} \quad 1.3$$

Este parámetro es de suma importancia, pues permite conocer la viscosidad extrínseca ya que:

$$\eta_{rel} = \eta_{sp} + 1 \quad 1.4$$

Donde η_{sp} corresponde a la viscosidad extrínseca del polímero. La relación entre η_{sp} y la concentración del polímero muestra el valor correspondiente a la viscosidad reducida, η_{red} . Una vez conocidas las fórmulas necesarias, se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 3. Valores obtenidos para el CS para cada parámetro tras aplicar la teoría.

Blanco (s)	Concentración (g/dL)	Tiempo (s)	η_{rel}	η_{sp}	η_{sp}/C	$\ln(\eta_{rel}/C)$
49	0,2	151	3,08	2,08	10,41	3,95
	0,16	124	2,53	1,53	9,59	4,09
	0,12	101	2,07	1,07	8,88	4,30
	0,08	81	1,65	0,65	8,16	4,63
	0,04	63	1,29	0,29	7,24	5,20

Una vez obtenidos dichos valores, se pueden obtener las rectas de Huggings y Kraemer representando η_{sp}/C frente a la concentración para Huggings y $\ln(\eta_{rel}/C)$ para Kraemer, obteniendo lo siguiente:

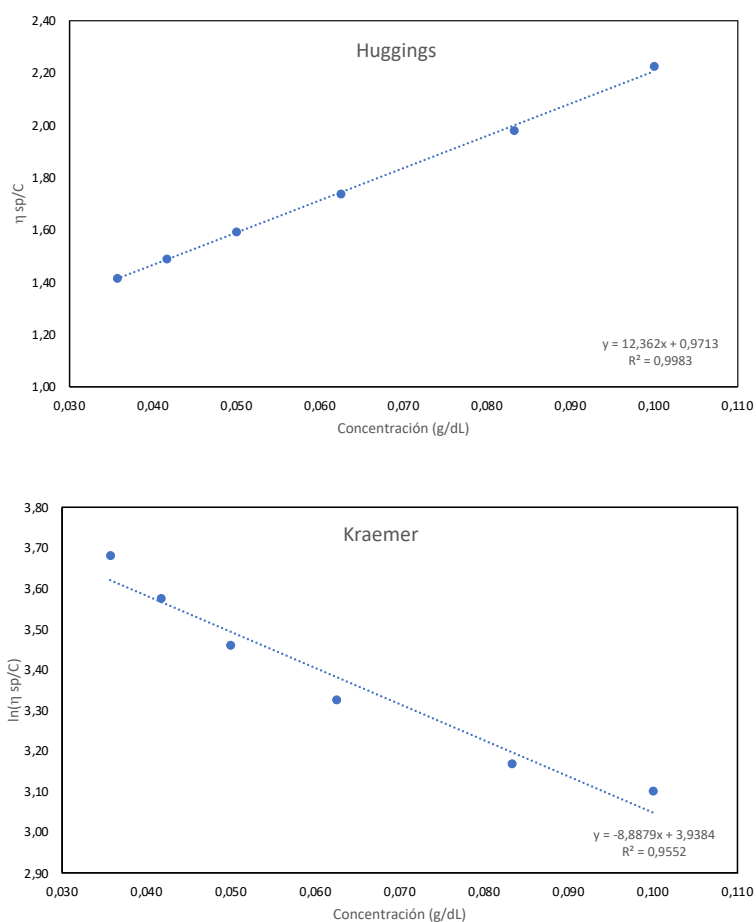


Figura 14. Representación de las ecuaciones de Huggings y Kraemer para obtener el valor correspondiente con $[\eta]$.

Una vez obtenidas las dos rectas, se debe obtener los valores correspondientes al intercepto de cada una de ellas. En base a las ecuaciones descritas, realizando el promedio

entre los interceptos para cada una de las rectas, obteniéndose así, el valor correspondiente a $[\eta]$.

Tabla 4. Valores para los interceptos de Huggings y Kraemer. Valor de la viscosidad final para el CS.

Intercepto H	Intercepto K	$[\eta]$
0,97	3,94	2,45

De esta manera se obtuvo que el valor para la viscosidad intrínseca del quitosano sin modificar es de 2,45.

De igual forma a la descrita anteriormente, se realizaron las medidas correspondientes para el CSPBA-90 obteniéndose lo siguiente:

Tabla 5. Valores obtenidos para el CSPBA-90 tras aplicar la teoría.

Blanco (s)	Concentración (g/dL)	Tiempo (s)	η_{rel}	η_{sp}	η_{sp}/C	$\ln(\eta_{rel}/C)$
49	0,100	109	2,22	1,22	12,24	3,10
	0,083	97	1,98	0,98	11,76	3,17
	0,063	85	1,74	0,74	11,82	3,33
	0,050	78	1,59	0,59	11,84	3,46
	0,042	73	1,49	0,49	11,75	3,58
	0,036	69	1,42	0,42	11,66	3,68

Aplicando la misma metodología que en el caso anterior, con las rectas de Huggings y Kraemer se obtuvo el valor correspondiente para la viscosidad:

Tabla 6. Valores para el intercepto de Huggings y Kraemer. Valor de la viscosidad final para el CSPBA-90.

Intercepto H	Intercepto K	$[\eta]$
6,53	5,34	5,94

El valor final correspondiente a la viscosidad intrínseca del material fue de 5,94. Realizando una comparación entre los valores obtenidos para el CS y para el CSPBA-90, se puede destacar el aumento notable de la misma al realizar la modificación. Esto puede tener su explicación en varios fenómenos, pero la hipótesis más apoyada en la interacción

de las cadenas de biopolímero con el solvente. El CSPBA-90 ha mostrado una gran capacidad de solubilidad en el solvente, siendo claramente superior al CS sin modificar. Sin embargo, el valor obtenido para la viscosidad intrínseca es notablemente superior, esto es debido a que las cadenas del CSPBA-90 interactúan mucho más con el disolvente, provocando que las cadenas poliméricas se estiren más que las del CS. Esta interacción puede, en cierta forma, modificar el movimiento de la cadena polimérica en el solvente, dando lugar a un cambio de viscosidad. Por otra parte, se debe tener en cuenta la siguiente ecuación:

$$[\eta] = k \cdot M_v^\alpha \quad 1.5$$

La ecuación 1.5 permite relacionar la viscosidad extrínseca con el peso molecular viscosimétrico, M_v . Además, existen dos parámetros principales que son la k y la α , los cuales son específicos para cada polímero en cada disolvente. Al no disponer de los valores de k y α no es posible la obtención del M_v para CSPBA-90.

4.4 Formación del hidrogel

Una vez los materiales fueron caracterizados, se procedió con la formación del hidrogel. En este caso, se tenían antecedentes en el grupo con este material, conociendo que a una concentración de 30 mg/mL se obtenía un sistema hidrogel. No obstante, se decidió estudiar un barrido de concentraciones para obtener la concentración de gelificación óptima para poder trabajar con dicho material. Para ello se experimentó variando las concentraciones de los materiales desde 10 mg/mL hasta 80 mg/mL. Es importante destacar que al no existir diferencias significativas entre los diferentes materiales se decidió realizar todos los experimentos siguientes con el CSPBA-90. Tras realizar dichos experimentos se observó que a concentraciones por debajo de 30 mg/mL no se obtiene ningún hidrogel. A partir de los 30 mg/mL, la consistencia del hidrogel va en aumento hasta los 80 mg/mL, en base a esto se determinó que la concentración de gelificación crítica (CGC) era 30 mg/mL.

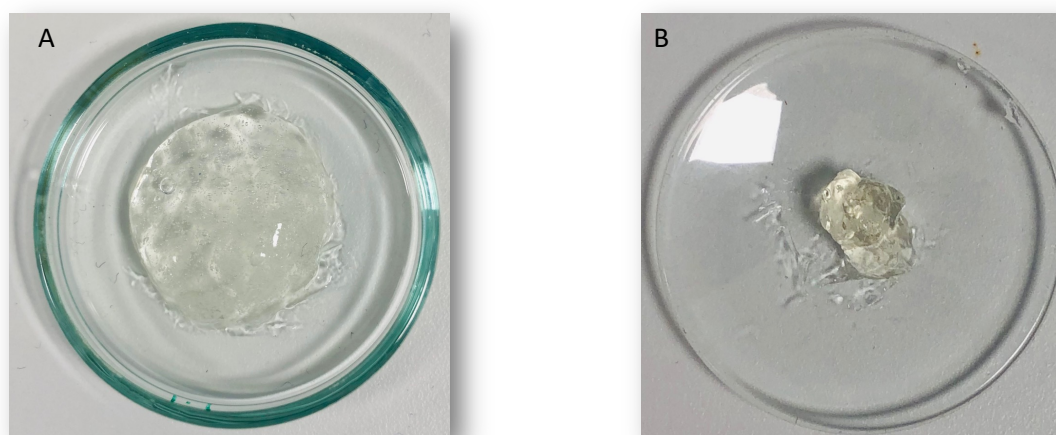


Figura 15. A) Hidrogel obtenido a una concentración de 30 mg/mL. B) Hidrogel obtenido a una concentración de 80 mg/mL.

Es importante conocer que la formación de los hidrogeles se produce sin la adición de disolución básica, por lo que es de esperar que en la formación de dicho sistema predominen fuerzas de tipo supramoleculares antes que las generadas por la química dinámica covalente. En este punto se planteó el estudio de la capacidad self-healing entre los hidrogeles con concentraciones de 30 mg/mL y 80 mg/mL. Para facilitar la discusión de los resultados obtenidos se decidió nombrar a cada uno como HG-30 y HG-80.

4.5 Estudio de la propiedad de autoregeneración

Para comprobar si los hidrogeles poseían esta capacidad de autoregeneración se decidió realizar diversas pruebas estándar para comprobar la eficacia de la propiedad. En primer lugar, se decidió cortar los hidrogeles en dos piezas diferentes, y una de estas fue coloreada con naranja de metilo. El color a una de las piezas ayuda a conocer si el proceso de regeneración se está llevando a cabo con éxito, pues transcurrido un tiempo debería difundir desde una pieza a otra. Las dos piezas fueron puestas en contacto estrecho sin la adición de base en la interfase entre ambas, obteniéndose lo siguiente.

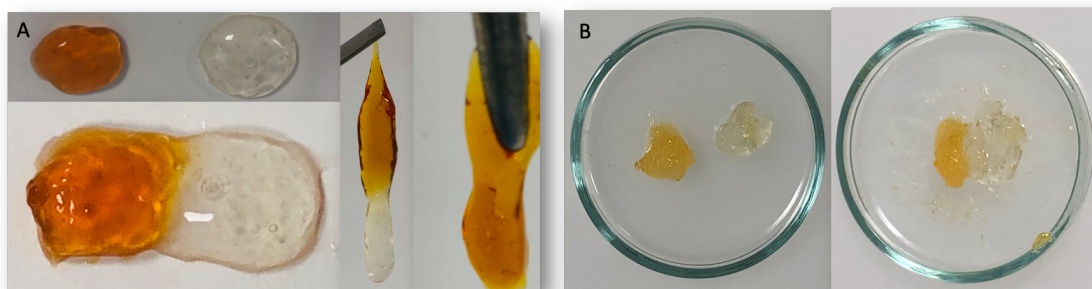


Figura 16. A) Proceso de autoregeneración de las dos piezas del hidrogel HG-30. B) Proceso fallido de autoregeneración para el HG-80.

Como se puede observar en la imagen A (Figura 16) al poner las dos piezas del HG-30 en contacto estrecho por 30 min se produce la regeneración sin la necesidad de adicionar disoluciones básicas. Además, se puede observar cómo transcurrido un tiempo, el color comienza a difundir de una pieza a otra, lo que indica que el proceso de autoregeneración ha sido exitoso. En la imagen B (Figura 10), se observan las dos piezas para el HG-80, se puede apreciar una notable diferencia en cuanto a la consistencia del material, sin embargo, al poner en contacto las dos piezas, estas simplemente se adhirieron entre sí sin dar lugar a la autoregeneración. Debido a esto, se decidió preparar una disolución tampón de ácido bórico, la cual fijaba el pH a 8,5, el cual está bastante cerca del medio óptimo para formar los ésteres de boronato ($pK_a=8,75$), tras la adición de unas gotas en la interfase de las piezas se obtuvo lo siguiente:

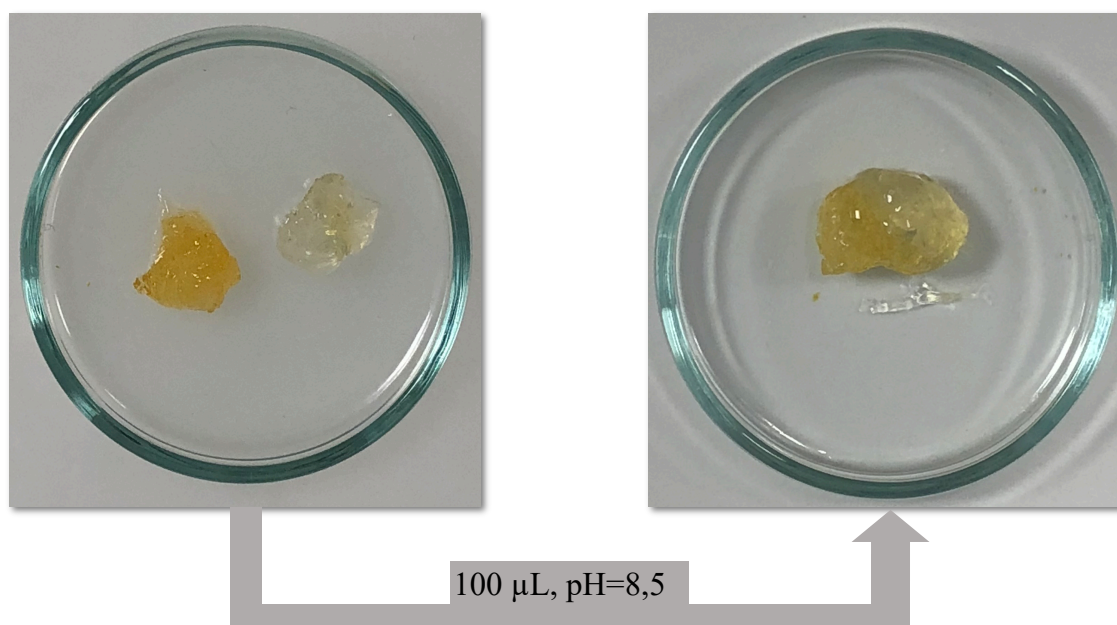


Figura 17. Proceso de autoregeneración entre las dos piezas del HG-80 tras la adición de 100 L de una disolución tampón de pH=8,5.

Como se puede observar en la Figura 17, tras la adición de tres gotas de disolución a pH=8,5 se obtiene la unión de las dos piezas incluyendo la difusión del color de una pieza a otra. Al haber empleado medio básico, se puede hipotetizar que dicho proceso está fuertemente dominado por la formación de los ésteres de boronato entre ambas piezas. Otra de las cosas más importantes de este experimento es la obtención del proceso en medio básico sin la precipitación del quitosano. Tras dicho experimento se planteó la posibilidad de mejorar la capacidad de autoregeneración del HG-30 adicionando 3 gotas al material para comprobar si este precipitaba o aumentaba su consistencia. El resultado fue el siguiente:

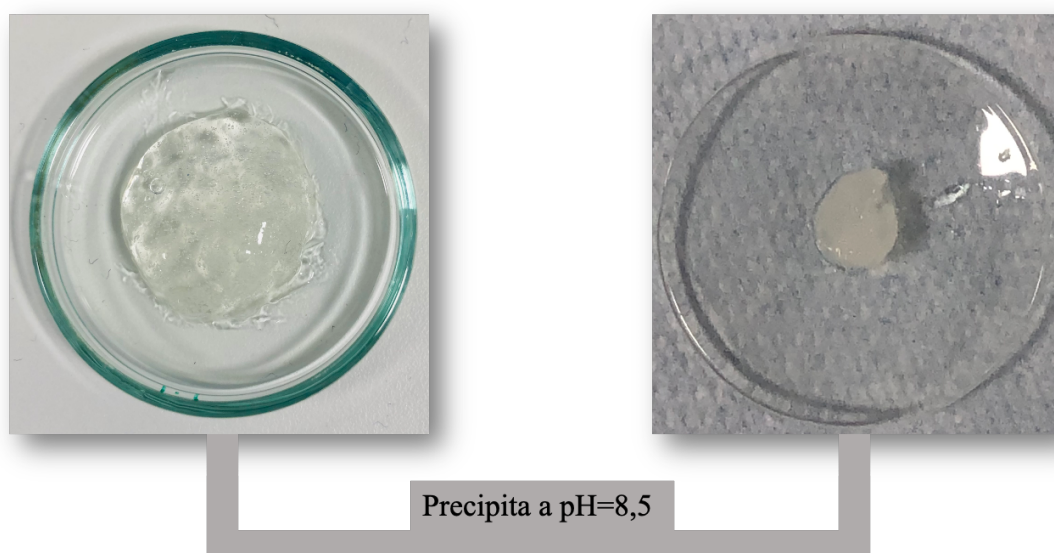


Figura 18. Adición de la disolución tampón de pH=8,5 al hidrogel HG-30, dando como resultado la precipitación del biopolímero.

Se observó que el HG-30 en medio básico no es capaz de realizar el proceso de autoregeneración, dando lugar a la precipitación del material. Como el HG-30 es capaz de realizar la autoregeneración sin la necesidad de medio básico, se cree que el adicionar el mismo se produce una desestabilización de la red polimérica. Esto puede deberse a cambios en la carga de la cadena del polímero, que afectarían enormemente colapsando las estructura.

En segundo lugar, se realizó un ensayo de elasticidad superficial entre el HG-30 y el HG-80. Para esto se realizó un elongamiento del material hasta el punto antes de su ruptura, en base a esto se calculó el porcentaje de deformación que es capaz de soportar. Debido a la consistencia del HG-30, es claramente mucho más elástico que el HG-80 pudiendo

estirarse en un 500 % su tamaño. Sin embargo, el HG-80, a pesar de aumentar notablemente su consistencia, es capaz de aumentar un 100 % su tamaño inicial.

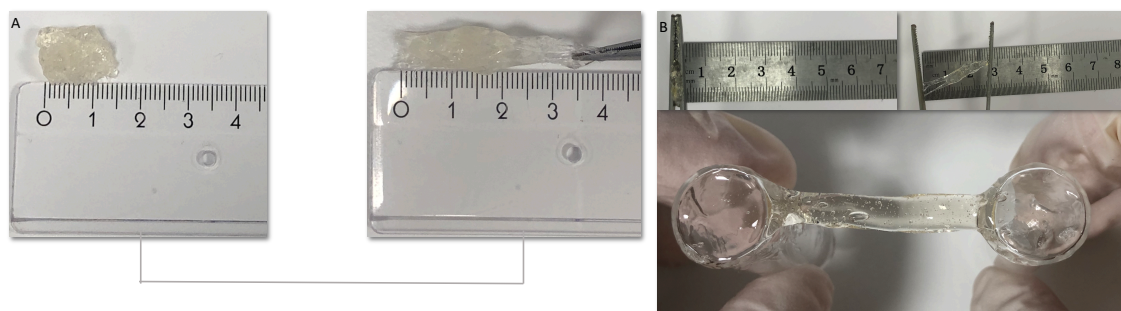


Figura 19. A) Ensayo de elongamiento realizado para el HG-80. B) Ensayo de elongamiento realizado para el HG-30.

En segundo lugar, se decidió comprobar la eficiencia de autoregeneración del material mediante la observación del proceso bajo microscopía óptica. Para ello, se decidió realizar un corte superficial en el hidrogel con un cúter y observar cómo se repara el daño a lo largo del tiempo. El resultado obtenido fue el siguiente:

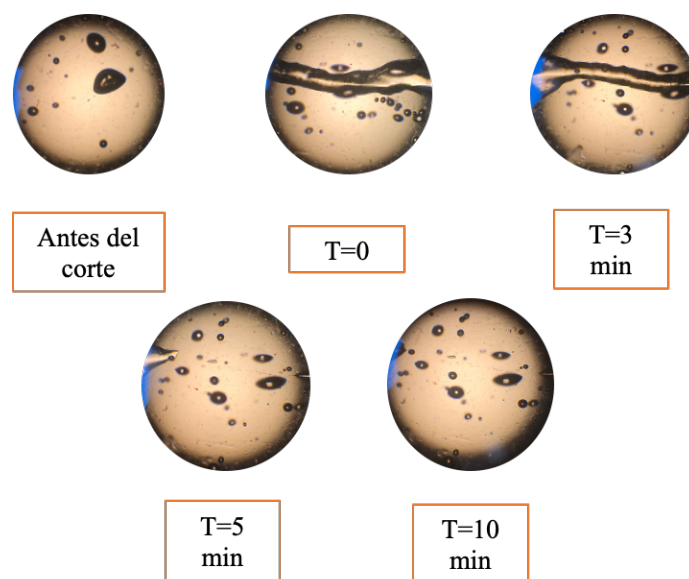


Figura 20. Imágenes obtenidas en el microscopio óptico a diferentes tiempos para el proceso de autoregeneración del HG-30.

En la Figura 20, se puede observar la evolución del corte a lo largo de 10 minutos. Este ensayo corresponde para el HG-30, presentando una velocidad de regeneración bastante elevada, ya que, en la mayoría de los ensayos de este tipo, los tiempos de regeneración oscilan entre los 30 y 20 minutos. Además, se ha logrado una regeneración completa del daño, únicamente quedando en la superficie del material algunas burbujas provocadas por

la introducción de aire al hidrogel. Para el HG-80, se realizó la misma prueba, realizando un corte similar. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

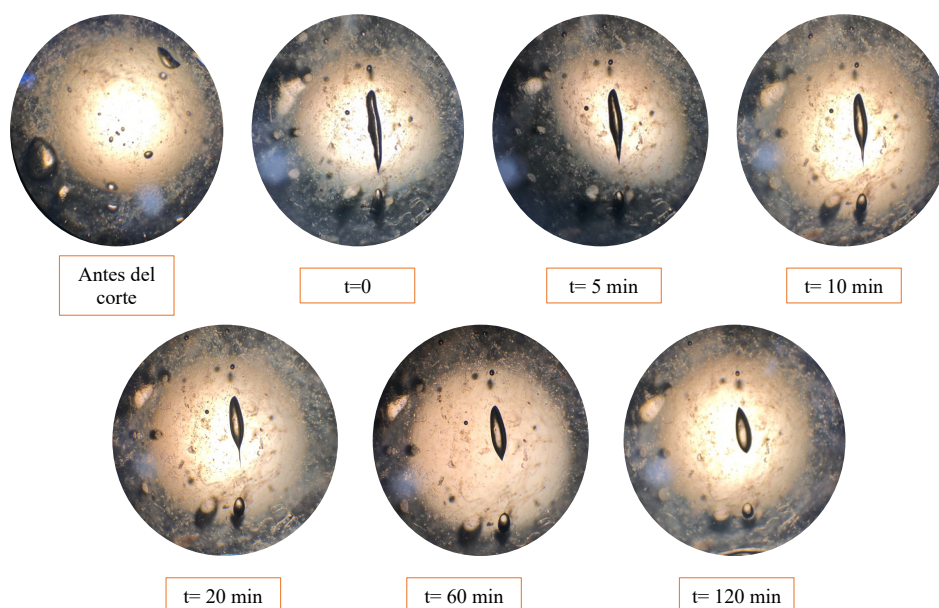


Figura 21. Imágenes obtenidas en el microscopio óptico para el proceso de autoregeneración para el HG-80.

El comportamiento que presenta el HG-80 como se puede observar en la Figura 21 es bastante diferente al presentado por el HG-30. En este caso, el proceso de regeneración toma mucho más tiempo incluso con la adición de la solución básica nombrada en el apartado anterior. Este comportamiento puede estar asociado al incremento de rigidez del material, impidiendo el flujo del material y por ende no permitiendo que tenga lugar la formación de ésteres de boronato. Como se puede observar en las imágenes obtenidas a 60 y 120 minutos, el daño se estabiliza, esto puede deberse a la introducción de aire en el corte. Desarrollando esta hipótesis, la poca capacidad de fluidez que presenta el material puede ser el motivo por el que el material no logra la regeneración total del daño. Al introducirse el aire, este bloquea la poca capacidad de unión posible entre las partes del corte, provocando que el material no logre regenerarse por completo y el daño evolucione eventualmente hacia una burbuja en el mismo.

4.6 Formación de películas y capacidad de autoregeneración

En base a la experiencia previa del grupo AFM-NANO,³⁰ donde se ha demostrado en numerosos trabajos que el quitosano, bajo unas condiciones determinadas es capaz de formar películas poliméricas flexibles, se decidió comprobar si los materiales preparados poseían dicha capacidad. Para ello se prepararon las películas de quitosano modificado

tal y como ha sido explicado anteriormente. Se logró la formación de películas empleando el material sustituido al 90% (Figura 22). Estas películas mostraban una gran flexibilidad bastante similar a la del quitosano sin modificar, lo que es un indicativo de la película ha mantenido sus propiedades iniciales.

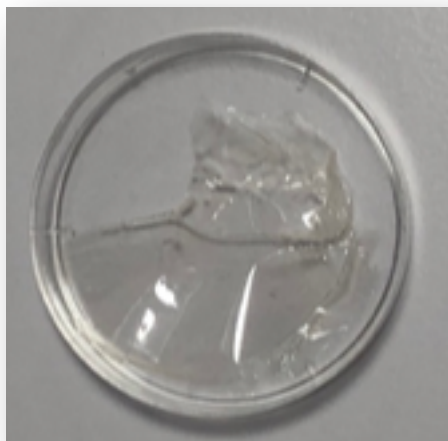


Figura 22. Película de quitosano depositada en una placa petri.

Se decidió realizar un corte en la superficie de la película y observar su evolución a largo de varios minutos para comprobar si era capaz de regenerar el daño causado. El resultado obtenido fue el siguiente:

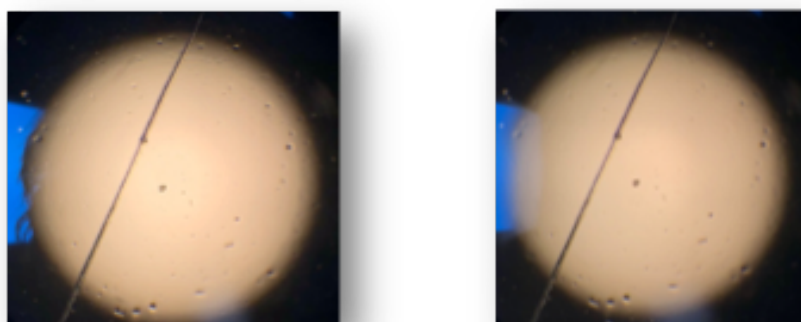


Figura 23. Evolución del daño sufrido en la superficie de la película observado mediante microscopía óptica.

Como se puede observar en la Figura 23, tras 2 horas de observación, la película no fue capaz de regenerar el daño. Esto puede deberse a que no existe ninguna manera en la que ambos lados del corte puedan llegar a estar en contacto, por lo que no podrá darse la formación de ésteres de boronato. Se decidió agregar unas gotas de la disolución básica de ácido bórico para comprobar si con esto se lograba iniciar el proceso de

autoregeneración. No se logró inicial la regeneración mediante este método, sin embargo, la película al entrar en contacto con las gotas de la solución básica sufrió un movimiento macroscópico, por lo que se decidió prestar atención a este y estudiarlo en profundidad.

La película fue cortada en una pequeña porción e introducida en la solución a pH aproximadamente 8,75. Se dejó sumergido durante dos horas obteniéndose lo siguiente.

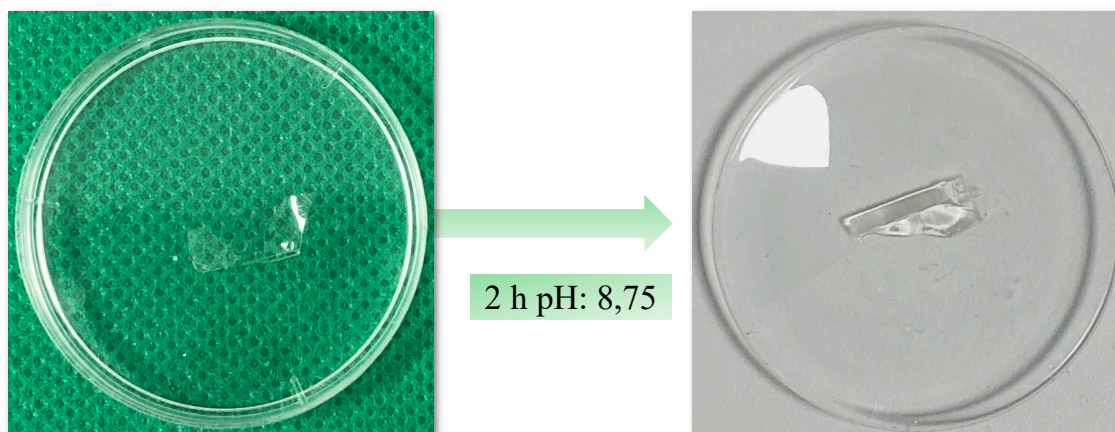


Figura 24. A la izquierda de la imagen se observa un trozo de la película en su estado natural. A la derecha de la imagen se encuentra el mismo trozo de película tras sumergirse en una disolución tampón de pH 8,5 durante 2 horas.

Tras 2 horas el trozo de película se plegó por completo (Figura 24), esto puede deberse a dos motivos principalmente. El primero de todos es la poca solubilidad del quitosano en medio básico, lo que propiciaría que las cadenas de polímero se contraigan dando lugar a dicho movimiento. El segundo, es la aparición de los ésteres de boronato, que producirían un aumento en el entrecruzamiento del sistema dando lugar a dicho fenómeno. Se intentó recuperar la forma inicial de la película, pero fue imposible ya que, antes de que se abriera por completo, el material se disolvía en agua, por lo que no pude ser posible obtener una reversibilidad del fenómeno.

4.7 Obtención de un sistema híbrido entre dos biopolímeros

En base a los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, se planteó la posibilidad de generar un sistema híbrido entre biopolímeros. Según la experiencia previa del grupo, el alginato era capaz de formar los ésteres de boronato consigo mismo. Así mismo, en este trabajo se ha confirmado que el quitosano es capaz de formar dichos enlaces dinámicos. Por tanto, se decidió mezclar las dos disoluciones iniciales de ambos biopolímeros, la del quitosano en menor concentración debido a que formaba el hidrogel in situ. Se mezclaron las dos disoluciones y se obtuvo lo siguiente:



Figura 25. Imágenes correspondientes al sistema híbrido CS-ALG, en el que se produce la precipitación de quitosano por un lado, mientras que el ALG es capaz de formar el hidrogel.

Al adicionar la disolución de pH 8,75 se observó que el alginato modificado con el PBA formaba el hidrogel correspondiente (Figura 25), mientras que el quitosano modificado se agrupaba por separado. Este hecho indica que cada biopolímero tiende a asociarse mayoritariamente consigo mismo. Este comportamiento también puede deberse a que los biopolímeros no llegaron a formar una disolución homogénea del mismo. Al no llevarse a cabo la formación de dicha disolución homogénea, no se lleva a cabo la interacción adecuada entre los mismos, dando lugar finalmente a dos sistemas geles separados.

4.8 Estudio de las propiedades mecánicas del HG-80

El material seleccionado para realizar las pruebas mecánicas fue el HG-80, ya que era el más consistente. Para ello se hizo uso del reómetro, el cuál es un instrumento que permite conocer diferentes propiedades mecánicas del sistema. En este caso se decidió realizar una prueba simple con la que poder confirmar el proceso de autoregeneración y, además, poder cuantificar la eficacia de este. Para esto, la muestra fue sometida a un experimento conocido como experimento oscilatorio. La base de este experimento es la aplicación de un esfuerzo sinusoidal, es decir, se somete la muestra bajo una frecuencia determinada y se mide su respuesta frente a este.³¹ Las deformaciones que sufre el material durante este experimento se denomina deformación sinusoidal y se expresa como:

$$\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t) \quad 2.1$$

Donde γ_0 corresponde a la amplitud de la onda de deformación, ω es la frecuencia de oscilación y t corresponde al tiempo. Es importante conocer que de la ecuación 2.1 puede extraerse más información, como el esfuerzo resultante de la deformación:

$$\tau = \tau_0 \sin(\omega t + \delta) \quad 2.2$$

Donde δ corresponde con el ángulo de fase. Este ángulo es cero si se trata de sólidos elásticos, sin embargo, si se tratara de un líquido newtoniano este ángulo sería de 90° . Sin embargo, el caso de los hidrogeles suele asemejarse a un comportamiento viscoelástico, por lo que el ángulo de fase se encontrará entre 0 y 90° .

Una vez conocidas las bases de este experimento, es de suma importancia conocer la ecuación que describe el comportamiento mostrado por el material. Matemáticamente, este comportamiento tiene un componente complejo, por lo que el esfuerzo se puede descomponer en dos partes. Un componente en fase y otro componente fuera de fase. En base a esto se enuncia la siguiente ecuación:

$$G^* = G' + i G'' \quad 2.3$$

En dicha ecuación, G' es el componente en fase y se conoce como módulo de almacenamiento. La G'' por su parte es la señal fuera de fase y se conoce como módulo de pérdidas. Ambos componentes se expresan matemáticamente de la siguiente manera:

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos \delta \quad 2.4$$

$$G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin \delta \quad 2.5$$

Una deducción que se puede obtener de las ecuaciones 2.4 y 2.5 es la siguiente:

$$\operatorname{tg} \delta = \frac{G''}{G'} \quad 2.6$$

Los parámetros G' y G'' son los que describen el comportamiento del material en su totalidad, pues indican si el material se comporta como un sólido o como un líquido. Por lo general, las fases en las que G'' es mayor que G' se afirma que el material se comporta como un líquido. Si lo que sucede es lo inverso, se afirma que el material se comporta como un sólido. Estos comportamientos son expresados en reogramas, los cuales recogen toda la información obtenida en los estudios de reología. Para este trabajo en particular se han representado los valores de G' y G'' frente a los valores de frecuencia empleados. Cabe destacar que la temperatura juega un papel crucial en este tipo de experimentos, pues la fluidez y deformación del material no será la misma a 20°C que si se realiza el experimento a 45°C . Debido a esto, se ha empleado un módulo acoplado al reómetro que permite el control de la temperatura. Este ha sido fijado a 25°C para todos los experimentos realizados.

Entrando más en detalle en lo referente a la interpretación de los reogramas, se pueden descomponer generalmente en 5 fases (Figura 26).

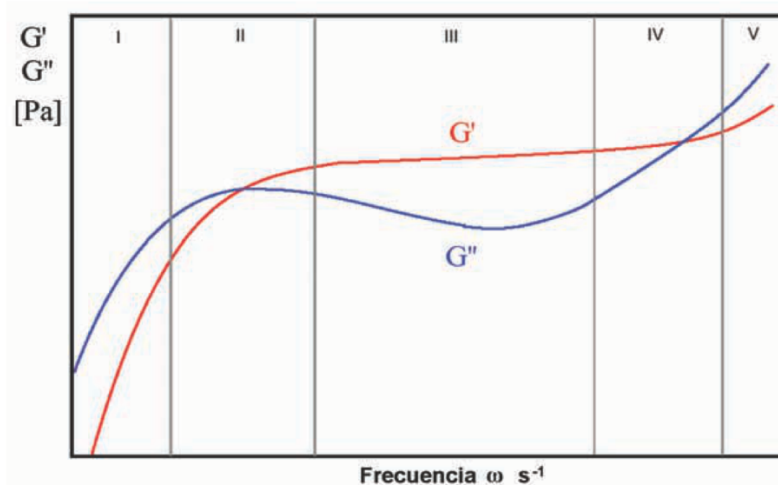
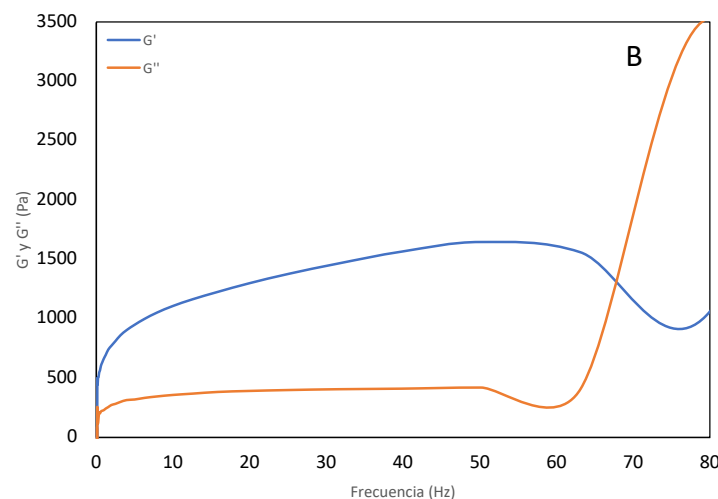
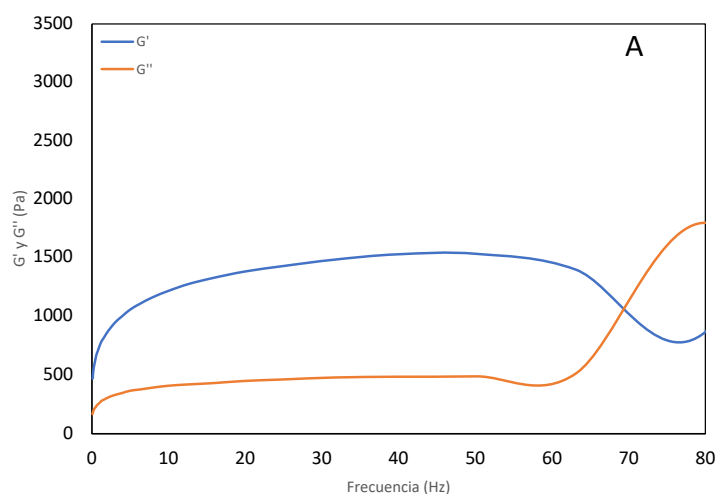


Figura 26. Representación de las 5 fases esperables de un material viscoelástico. Imagen adaptada con permiso de la referencia 32.

En primer lugar, la primera fase es común para todos los tipos de materiales, es comúnmente conocida como zona de flujo. En esta G'' es mayor que G' , lo que implica que el material se comporta como un líquido. Como se ha comentado, todos los materiales presentan esta zona, sin embargo, algunos requieren de frecuencias muy bajas, por lo que en algunos materiales no es observable. Seguidamente se encuentra la segunda fase correspondiente a la transición del material. En esta zona G' se vuelve mayor que G'' dando lugar al primer punto de corte entre ambos componentes. Este punto de corte indica el inicio del comportamiento viscoelástico. Por consecuencia, la tercera zona suele ser la predominante en este tipo de estudios, se basa en una meseta en la que G' se mantiene mayor que G'' , es decir, el material mantiene el comportamiento viscoelástico a medida que se aumenta la frecuencia. Una vez el material alcanza el máximo de deformación, colapsa hacia medio líquido, dando lugar a la aparición de la cuarta zona, en la que tiene lugar un nuevo punto de corte correspondiente a la zona de transición vítrea. Finalmente se encuentra una quinta zona que corresponde con la región puramente cristalina y existe un predominio de G'' .

Por lo general, las zonas I y II no suele aparecer en los reogramas, pues las frecuencias a las que se suele trabajar omiten estas zonas, pasando directamente a la zona III y zona IV de las que se obtiene la mayor parte de la información.

Las condiciones empleadas para este experimento fueron las descritas anteriormente, se fijó la temperatura a 25 °C y se fijó la frecuencia en un rango de valores comprendido entre 10^{-1} y 10^2 Hz. Se emplearon 2 mL de muestra la cual fue depositada en la placa de muestreo del reómetro. La concentración empleada para el hidrogel fue del 8% ya que se determinó con anterioridad que era la óptima. Cabe destacar que se mantuvo un intervalo de 5 minutos entre los ensayos para comprobar la eficacia de autoregeneración del material. Este ensayo se realizó por triplicado obteniéndose los siguientes resultados:



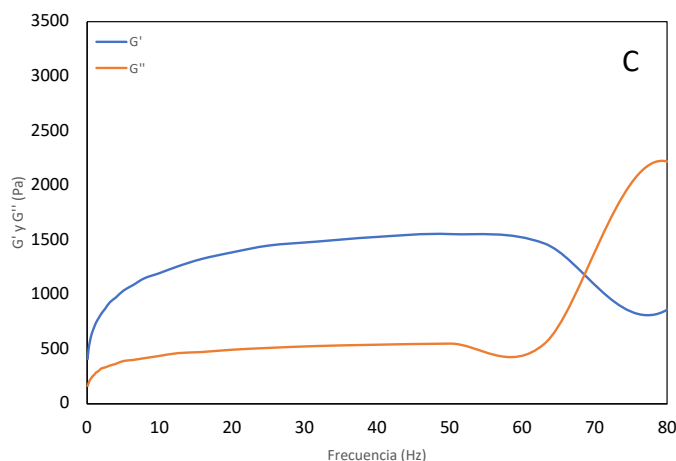


Figura 27. Ensayos realizados para el hidrogel al 8 % (p/v) del CSPBA-80, el tiempo transcurrido entre cada ensayo fue de 10 min. A) ensayo 1 B) ensayo 2, C) ensayo 3.

Como se puede observar (Figura 27), el comportamiento mostrado por el material para tres ciclos de autoregeneración es bastante similar. Como se comentó con anterioridad las fases I y II explicadas anteriormente no son apreciables, el material transiciona a frecuencias muy bajas a la fase III. En esta fase mantiene la proporción entre G' y G'' con bastante consistencia entre los ensayos, llegando al punto de colapso en valores similares. En base a lo observado en este ensayo, se puede concretar que el CSPBA-90 posee un comportamiento viscoelástico cuando se somete a frecuencias aproximadamente entre 0-70 Hz. Los datos obtenidos de este estudio son los siguientes:

Tabla 7. Valores obtenidos para G' y G'' iniciales, comparativa entre ensayos y eficacia del proceso de autoregeneración.

	G'_0 (Pa)	G''_0 (Pa)	Intersección	Eficacia (%)
Ensayo 1	471,59	165,00	68,79	100
Ensayo 2	445,45	161,08	68,40	99,95
Ensayo 3	444,61	130,22	67,60	98,30

Como se puede observar en la Tabla 7, los valores tras 5 minutos de reposo se han recuperado prácticamente sin pérdida alguna en los valores de almacenamiento y el módulo de carga. Otro punto al que se debe prestar especial atención es la frecuencia a la que se produce el colapso del sistema. En los ensayos realizados, la variación ha resultado ser mínima, por lo que el esfuerzo que puede soportar en el tiempo se mantiene constante. La observación de este comportamiento confirma que el material es capaz de autoregenerarse como se vio en los apartados anteriores, sino que, además es capaz de mantener sus propiedades mecánicas inalteradas o con una variación prácticamente

despreciable. Para cuantificar la eficacia de curación, se emplearon los valores de intersección, comparándolos entre sí (Tabla 7). Al hacer estos cálculos se obtiene que la mayor variación tiene lugar en el 3 ciclo con un 98,3 % de eficacia, lo cual es considerado un buen resultado porque la pérdida no es significativa. Realizando una breve comparación con el sistema de inspiración, el alginato modificado, el sistema propuesto para el quitosano es, aparentemente, igual de válido que el alginato. El hidrogel de alginato mantenía intactas sus propiedades mecánicas tras 10 minutos de recuperación, al igual que el quitosano.

5. Conclusiones y perspectiva futura

A lo largo del trabajo se han logrado cumplir los diferentes objetivos fijados al inicio de este. La ruta sintética propuesta ha sido válida para la modificación que se planteaba para el biopolímero, obteniéndose la correcta modificación del quitosano. La caracterización del material resultó exitosa demostrando la adición de los grupos al quitosano, además de obtener diferentes parámetros como puede ser la viscosidad intrínseca. El material sintetizado mostró una mejor solubilidad en agua que el material de partida, sin embargo, en términos de viscosidad intrínseca el CSPBA-90 demostró ser más viscoso que el CS en medio acuoso.

Se logró la obtención del hidrogel con una concentración del 8% (p/v), mostrando una gran capacidad de autoregeneración. Se logró catalizar el proceso de autoregeneración mediante el empleo de una disolución básica a pH=8,75, siendo este el óptimo para formar los ésteres de boronato. El material presentó buenas propiedades mecánicas, además de conservarlas tras reparar el daño sufrido, con una eficiencia de curación del 98 %. El material propuesto muestra un comportamiento similar al propuesto para el Alginato empleado como inspiración de este trabajo.

Como trabajo de futuro se plantea la modificación de otros biopolímeros para confirmar que la hipótesis planteada puede aplicarse a diversos materiales. Además, se deberá trabajar en la obtención de un sistema híbrido homogéneo, así como explorar el empleo de otros mecanismo de autoregeneración basados en otras reacciones como pueden ser la Diels-Alder o la formación puentes disulfuro.

6. Bibliografía

- [1] F. Schaufelberger, B. J. J. Timmer, O. Ramström. Dynamic Covalent Chemistry: Principles, Reactions and Applications, Wiley, **2017**, 1-30.
- [2] Y. Jin, C. Yu, R. J. Denman, W. Zhang. Recent advances in dynamic covalent chemistry, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 6634-6654.
- [3] S. J. Rowan, S. J. Cantrill, G. R. L. Cousins, J. K. M. Sanders, J. F. Stoddart, Dynamic Covalent Chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 898-952.
- [4] Y. Jin, C. Yu, R. J. Denman, W. Zhang, Recent advances in Dynamic Covalent Chemistry. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 16, 6634-6654.
- [5] Y. Jin, Q. Wang, P. Taynton, W. Zhang, Dynamic covalent chemistry approaches toward macrocycles, molecular cages, and polymers. *Acc. Chem. Res.*, **2014**, 47, 1575-1586.
- [6] M. E. Belowich, J. F. Stoddart, Dynamic imide chemistry, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 2003-2024.
- [7] M. dF. Capela, Dr. N. J. Mosey, L. Xing, Dr. R. Wang, Dr. A. Petitjean, Amine exchange in formamidines: An experimental and theoretical study. *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, 4598-4612.
- [8] G. Joshi, E. V. Anslyn, Dynamic thiol exchange with β -sulfido- α,β -unsaturated carbonyl compounds and dithianes. *Org. Lett.*, **2012**, 14, 4714-4717.
- [9] R. Nishiyabu, T. D. James, J. S. Fossey, Boronic acid building blocks: tools for self assembly. *Chem. Comm.*, **2011**, 47, 1124-1150.
- [10] P. Reutenauer, E. Buhler, P. J. Boul, S. J. Candau, J.-M. Lehn, Room temperature dynamic polymers based on Diels-Alder chemistry. *Chem. Eur. J.*, **2009**, 15, 1893-1900.
- [11] B. Masci, S. Pasquale, P. Thuéry, Supramolecular control of a fast and reversible Diels-Alder reaction. *Org. Lett.*, **2008**, 10, 4835-4838.
- [12] R. C. Boutelle, B. H. Northrop, Substituent effects on the reversibility of furan-maleimide cycloadditions. *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 7994-8002.
- [13] C. W. Bielawski, R. H. Grubbs, Living ring-opening metathesis polymerization. *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, 32, 1-29.
- [14] A. Pettignano, S. Grijalvo, M. Häring, Rm Eritja, N. Tanchoux, F. Quignard, D. Díaz Díaz, Boronic acid-modified alginate enables direct formation of injectable, self-healing and multistimuli-responsive hydrogels. *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 3350-3353.
- [15] Y. Li, X. G. Chen, N. Liu, C. S. Liu, C. G. Liu, X. H. Meng, L. J. Yu, J. F. Kenedy, Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosam acetates. *Carbohydr. Polym.*, **2007**, 67, 227-232.

- [16] M.R. Kasaai, J. Arul, G. Charlet, Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan. *J. Polym. Sci. Part b Polym. Phys.*, 2000, 38, 2591-2598.
- [17] D. Bartczak, A. G. Kanaras, Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/Sulfo-NHS coupling. *Langmuir*, **2011**, 27, 10119-10123.
- [18] L. R. Arcot, M. Lundahl, O. J. Rojas, J. Laine, Asymmetric cellulose nanocrystals: thiolation of reducing end groups via NHS-EDC coupling. *Cellulose*, **2014**, 21, 4209-4218.
- [19] J. Li, W. Hu, Y. Zhang, H. Tan, X. Yan, L. Zhao, H. Liang, pH and glucose dually response injectable hydrogel prepared by *in situ* crosslinking of phenylboronic modified chitosan and oxidized dextran. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Sci.*, **2015**, 53, 1235-1244.
- [20] Z. Wu, S. Zhang, X. Zhang, S. Shu, T. Chu, D. Yu, Phenylboronic acid grafted chitosan as a glucose-sensitive vehicle for controlled insulin release. *J. Pharma. Sci.*, **2011**, 6, 2278-2286.
- [21] A. Zuriarrain, J. Zuriarrain, A. I. Puertas, M. T. Dueñas, I. Berregi, Quantitative determination of lactic and acetic acids in cider by ¹-H NMR. *Food Control*, **2015**, 52, 49-53.
- [22] M. Gorman, The evidence from infrared spectroscopy for hydrogen bonding. *J. Chem. Educ.*, **1957**, 34, 304-306.
- [23] X. Qu, A. Wirsén, A. C. Albertsson, Novel pH sensitive chitosan hydrogels: swelling behaviour and states of water. *Polymer*, **2000**, 41, 4589-4598.
- [24] K. Kurita, Controlled functionalization of the polysaccharide chitin, *Prog. Polym. Sci.* **2001**, 26, 1921-1971.
- [25] M. Méndez-López, V. Moreno-Serna, R. Inostroza-Rivera, A. Ramos, L. Molero, S. bonardd, D. Díaz Díaz, A. Leiva, C. Saldías, Optical and Electronic activities of biobased films of chitosan/POTE containing gold nanoparticles: Experimental and theoretical analyses. *Eur. Polym. J.*, **2018**, 108, 235-249.
- [26] C. Castro, L. Gargallo, D. Radic, G. Kortaberria, I. Mondragon, Blends containing chitosan and poly(sodium-4-styrene sulphonate). Compatibility behavior. *Carbohydr. Polym.*, **2011**, 83, 81-87.
- [27] D. De Britto, S. P. Camapana-Filho, Kinetics of the thermal degradation of chitosan. *Thermochim. Acta.*, **2007**, 465, 73-82.
- [28] C. Q. Qin, Y. M. Du, L. Xiao, Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan. *Polym. Degrad. Stab.*, **2002**, 76, 211-218.
- [29] R. D. Sudduth, Development of Huggins' and Kraemer's equations for polymer solutions evaluations from the generalized viscosity model for suspensions. *J. Appl. Polym. Sci.*, **1997**, 66, 2319-2332.

[30] O. Ramirez, S. Bonarrrd, C. Saldías, D. Radic, A. Leiva, Biobased chitosan nanocomposite films containing gold nanoparticles: obtainment, characterization, and catalytic activity assessment. *ACS Appl. Mat. Interfaces*. **2017**, 9, 16561-16570.

[31] O. Rojas, M. I. Briceño, J. Avendaño, Fundamentos de reología. Cuaderno FIRP S521-C. **2012**, versión 3.