



**Optimización de propiedades fisicoquímicas de hidrogel obtenido a partir de quitosano y  
celulosa bacteriana mediante un diseño central compuesto**

Pacheco Sarcos, Cristian David

Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica

Carrera de Petroquímica

Trabajo de Unidad de Integración Curricular, previo a la obtención del título de  
Petroquímico

Ing. J. Javier Sayavedra Delgado. Msc

03 de Febrero del 2023

Latacunga - Ecuador

## Reporte de verificación de contenido



**CERTIFICADO DE ANÁLISIS**  
magister



Firmado electrónicamente por:  
**JONATHAN JAVIER SAYAVEDRA DELGADO**

Pacheco\_Sarcos\_Cristian\_David

2%

Similitudes

< 1%

Texto entre comillas

0%

similitudes entre comillas

< 1%

Idioma no reconocido

**Nombre del documento:** Pacheco\_Sarcos\_Cristian\_David.pdf

**ID del documento:** 640971bf100314834fa3051d51721b04abd55028

**Tamaño del documento original:** 3,51 Mo

**Depositante:** JONATHAN JAVIER SAYAVEDRA DELGADO

**Fecha de depósito:** 21/2/2023

**Tipo de carga:** interface

**fecha de fin de análisis:** 21/2/2023

**Número de palabras:** 19.602

**Número de caracteres:** 140.729

Ubicación de las similitudes en el documento:



### Fuentes principales detectadas

Nº	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	 <a href="https://repositorio.uta.edu.ec">repositorio.uta.edu.ec</a>   Aislamiento y caracterización de cepas nativas de Komagata... https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/bitstream/123456789/34967/1/BQ_308.pdf 1 fuente similar	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (121 palabras)
2	 <b>TRABAJO DE INTEGRACION CURRICULAR FONSECA CRISTIAN.pdf</b>   TRABAJO... #f20a0a El documento proviene de mi grupo 2 fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (56 palabras)
3	 <a href="https://biblioteca.espe.edu.ec">biblioteca.espe.edu.ec</a> https://biblioteca.espe.edu.ec/Wp-content/uploads/2022/04/FormatosTrabajosdeTitulacion2022.docx#:... 2 fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (55 palabras)
4	 <a href="https://repositorio.espe.edu.ec">repositorio.espe.edu.ec</a>   Estudio de la producción de la carragenina y su demanda ... http://repositorio.espe.edu.ec:8080/bitstream/21000/25022/4/T-ESPEL-IPE-0098.pdf.txt	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (52 palabras)
5	 <a href="http://www.scielo.org.co">www.scielo.org.co</a>   Andamios eletrohilados de poli(e-caprolactona) /colágeno con u... http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-74882019000200197	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (41 palabras)

### Fuentes con similitudes fortuitas

Nº	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	 <a href="https://repositorio.uta.edu.ec">repositorio.uta.edu.ec</a>   Desarrollo de un método para la obtención de Quitosano a ... https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/bitstream/123456789/10933/BQ1_Ref_3332.pdf	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (24 palabras)
2	 <a href="http://repositorio.yachaytech.edu.ec">repositorio.yachaytech.edu.ec</a>   Extraction Process, Deacetylation Analysis, Function... http://repositorio.yachaytech.edu.ec/bitstream/123456789/208/1/ECFN0035.pdf	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (18 palabras)
3	 <a href="https://link.springer.com">link.springer.com</a>   A review of culture media for bacterial cellulose production: com... https://link.springer.com/article/10.1007/s10570-021-03754-5	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (15 palabras)
4	 <a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a>   Films and biocomposites based on agro-industrial wastes and by-pr... http://hdl.handle.net/10810/35085	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (15 palabras)
5	 <a href="https://rsdjournal.org">rsdjournal.org</a> https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/download/18711/16721/231698	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (11 palabras)



**Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica**

**Carrera de Petroquímica**

### **Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Optimización de propiedades fisicoquímicas de hidrogel obtenido a partir de quitosano y celulosa bacteriana mediante un diseño central compuesto”** fue realizado por el señor **Pacheco Sarcos, Cristian David**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Latacunga, 03 de febrero de 2023

-----  
**Ing. Jonathan Javier Sayavedra Delgado. Msc**

C.C:0502865850



Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica

Carrera de Petroquímica

### Responsabilidad de Autoría

Yo, **Pacheco Sarcos, Cristian David**, con cédula de ciudadanía n° 0922878186, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo integración curricular: **“Optimización de propiedades fisicoquímicas de hidrogel obtenido a partir de quitosano y celulosa bacteriana mediante un diseño central compuesto”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Latacunga, 03 de febrero de 2023



Pacheco Sarcos, Cristian David

C.C: 0922878186



Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica

Carrera de Petroquímica

### Autorización de Publicación

Yo, **Pacheco Sarcos, Cristian David**, con cédula de ciudadanía n° 0922878186, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Optimización de propiedades fisicoquímicas de hidrogel obtenido a partir de quitosano y celulosa bacteriana mediante un diseño central compuesto** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Latacunga, 03 de febrero del 2023



Pacheco Sarcos, Cristian David

C.C: 0922878186

## Dedicatoria

Es con un inmenso placer que comparto con ustedes el logro de haber completado mi tesis. A lo largo de mi tiempo en la universidad, he aprendido mucho sobre mí mismo y sobre las cosas que son importantes para mí.

Pero lo más importante que he aprendido es que ningún logro es posible sin el apoyo y la motivación de aquellos que amamos. Mi familia y amigos han sido una fuerza constante en mi vida, y su amor y apoyo incondicional me han ayudado a superar las dificultades y a alcanzar mis metas. Por eso este trabajo lo dedico a mi madre que con su apoyo incondicional he podido lograr cada uno de mis objetivos, a mi hermano Byron el cual, con su carisma y entusiasmo, me brinda esas ganas para lograr las cosas y saber que hay algunas cosas que toca aprovechar en vida.

Este logro de hoy, de haber completado mi tesis, es un resultado directo de la combinación de mi esfuerzo y dedicación, junto con el amor y el apoyo que he recibido de ustedes. Les estoy eternamente agradecido por su papel en mi vida y en mi éxito.

Por eso, dedico esta tesis a mi familia y amigos, con todo mi amor y gratitud. Espero que este logro les haga sentir tan orgullosos como yo estoy de haberlo alcanzado.

¡Gracias de nuevo por su apoyo incondicional!

Atentamente,

Cristian David pacheco Sarcos

## Agradecimiento

Queridos familiares, amigos y tutor, permitidme empezar este agradecimiento con la más honestidad de mi ser. Esta tesis es un logro significativo en mi vida académica y no podría haberlo logrado sin su apoyo y guía.

En primer lugar, agradezco a mi tutor, el Ing. Javier Sayavedra Delgado, por su confianza en mí y por guiarme en cada paso del proceso. Su experiencia y conocimiento han sido un valioso recurso en la realización de mi tesis. También agradezco al ingeniero Mauricio Bedón por la paciencia y comprensión durante este tiempo y su constante motivación.

Además, agradezco a mi amigo Alvin Fusty por haber estado a la par durante todo el proceso de investigación y escritura de nuestras tesis. Su apoyo y competitividad han sido un factor relevante en mi progreso y en la mejora del desarrollo práctico y escrito de este documento. En nuestra carrera, hemos alcanzado un objetivo compartido y a lo largo de la vida es necesario recordar que, en un futuro, el que se haga millonario primero alojará al otro en su sótano. También agradezco a David Vinueza y Luis Yapa, grandes amigos que me han acompañado en toda la carrera y han aportado momentos gratos.

Por último, pero no menos importante, agradezco a mi familia por su amor incondicional y su apoyo constante. Aunque estoy lejos, su confianza en mi capacidad y su valoración por mi esfuerzo han sido una fuerza motriz para mí. Estoy agradecido por su amor y por estar ahí, aun cuando estoy lejos. En resumen, esta tesis es el resultado de años de esfuerzo y dedicación y no podría haberlo logrado sin su apoyo y guía. Les agradezco sinceramente a cada uno de ustedes por haber formado parte de este logro y por ser una fuente constante de inspiración y motivación.

Con el mayor agradecimiento,

Cristian David Pacheco Sarcos

# Índice de contenidos

Caratula .....	1
Reporte de verificación de contenido.....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de autoría .....	4
Autorización de publicación .....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimiento.....	7
Índice de contenidos .....	8
Índice de tablas .....	12
Índice de figuras .....	13
Índice de ecuaciones.....	15
Índice de abreviaturas .....	16
Resumen.....	17
Abstract .....	18
Capítulo I: Generalidades .....	19
Introducción.....	19
Justificación e Importancia .....	20
Alcance .....	21
Objetivos.....	21
<i>Objetivo General</i> .....	21
<i>Objetivos Específicos</i> .....	21
Hipótesis .....	22
Variables de Investigación.....	22
<i>Variables Dependientes</i> .....	22
<i>Variables Independientes</i> .....	22
Capítulo II: Marco teórico .....	23
Polisacáridos .....	23
<i>Quitina</i> .....	24
<i>Quitosano</i> .....	25
<i>Celulosa Bacteriana</i> .....	26
Polisacáridos en la Medicina.....	27

<i>Actividades Biológicas de los Polisacáridos</i> .....	27
<b>Biopolímeros en la Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa</b> .....	29
<i>Quitosano como Biopolímero Aplicado en la Medicina</i> .....	31
<i>Usos de Celulosa Bacteriana en la Medicina</i> .....	32
<b>Acetobacter Xylinum</b> .....	32
<b>Hidrogel</b> .....	33
<i>Agentes Reticulantes</i> .....	36
<b>Caracterización de Biopelícula Quitosano-Celulosa Bacteriana</b> .....	37
<i>Contenido de Humedad</i> .....	37
<i>Fracción Gel</i> .....	38
<i>Espectroscopía Infrarroja</i> .....	39
<i>Grado de Desacetilación</i> .....	41
<i>Viscosidad</i> .....	43
<i>Contenido de Ceniza</i> .....	43
<i>Análisis Termogravimétrico</i> .....	44
<b>Diseño Experimental</b> .....	44
<i>Diseño Central Compuesto</i> .....	44
<b>Capítulo III: Metodología</b> .....	46
<b>Equipos, Materiales y Reactivos</b> .....	46
<i>Equipos</i> .....	46
<i>Materia Prima</i> .....	46
<i>Materiales</i> .....	46
<i>Reactivos</i> .....	47
<b>Obtención de Residuo de Camarón</b> .....	47
<b>Obtención de Acetobacter Xylinum</b> .....	47
<b>Proceso de Obtención de Quitosano</b> .....	48
<i>Limpieza y Preparación de Materia Prima</i> .....	49
<i>Despigmentación</i> .....	50
<i>Desproteínización</i> .....	50
<i>Desmineralización</i> .....	51
<i>Desacetilación</i> .....	51
<i>Determinación de Grado de Desacetilación del Quitosano</i> .....	52
<b>Proceso de Obtención de Celulosa Bacteriana</b> .....	52

<i>Cultivo de Acetobacter Xylinum</i> .....	53
<i>Extracción de Celulosa Bacteriana</i> .....	54
<i>Purificación de Celulosa Bacteriana</i> .....	54
<i>Neutralización, Secado y Pulverizado</i> .....	54
<i>Procesos de Lavado Continuo</i> .....	55
<i>Películas de Quitosano y Celulosa Bacteriana para Análisis Ir</i> .....	55
<i>Contenido de Humedad</i> .....	56
Proceso para el Desarrollo de Biopelículas de Quitosano-Celulosa Bacteriana.....	56
Diseño Central Compuesto.....	56
<i>Biopelículas de Quitosano-Celulosa Bacteriana en Agua</i> .....	58
<i>Biopelículas de Quitosano-Celulosa Bacteriana Ajustando el pH</i> .....	59
<i>Medición de Viscosidad de Hidrogeles a Base de Películas de Quitosano y Celulosa Bacteriana</i> .....	59
Análisis Termogravimétrico .....	60
Capítulo IV: Resultados y Discusión .....	61
Obtención de Quitosano .....	61
<i>Espectroscopia Infrarroja (IR) de Quitosano</i> .....	62
<i>Grado De Desacetilación Del Quitosano</i> .....	64
Obtención De Celulosa Bacteriana .....	67
<i>Espectroscopía Infrarroja (IR) De Celulosa Bacteriana</i> .....	68
Contenido De Humedad .....	69
Obtención De Biopelícula De Quitosano-Celulosa Bacteriana .....	69
Análisis del Diseño Central Compuesto .....	72
<i>Fracción Gel</i> .....	72
<i>Viscosidad</i> .....	79
Análisis Termogravimétrico .....	85
<i>Análisis Termogravimétrico De Quitosano</i> .....	85
<i>Análisis Termogravimétrico De Celulosa Bacteriana</i> .....	86
<i>Análisis Termogravimétrico De Biopelícula De Quitosano Y Celulosa Bacteriana</i> .....	87
Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones.....	90
Conclusiones.....	90
Recomendaciones.....	91
Bibliografía .....	92

**Anexos.....103**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> <i>Actividades biológicas de algunos polisacáridos.</i> .....	<b>28</b>
<b>Tabla 2</b> <i>Biopolímeros utilizados como hidrogeles en aplicaciones cosméticas.</i> .....	<b>35</b>
<b>Tabla 3</b> <i>Bandas características de quitosano de diferentes grados de desacetilación.</i> .....	<b>40</b>
<b>Tabla 4</b> <i>Combinaciones de quitosano, celulosa bacteriana y gelatina para la producción de biopelículas.</i> .....	<b>56</b>
<b>Tabla 5</b> <i>Diseño compuesto central para la formación de biopelículas de quitosano y celulosa bacteriana.</i> .....	<b>58</b>
<b>Tabla 6</b> <i>Valores de absorbancia necesarios para la determinación del grado de desacetilación del quitosano.</i> .....	<b>66</b>
<b>Tabla 7</b> <i>Resultado de grado de desacetilación empleando el método IR.</i> .....	<b>66</b>
<b>Tabla 8</b> <i>Contenido de humedad de muestras de quitosano y celulosa bacteriana.</i> .....	<b>69</b>
<b>Tabla 9</b> <i>Peso de película gelificada para cada combinación de quitosano, celulosa bacteriana y gelatina.</i> .....	<b>70</b>
<b>Tabla 10</b> <i>Determinación de fracción gel para cada matriz de QCB y gelatina.</i> .....	<b>72</b>
<b>Tabla 11</b> <i>Fracción gel después del ajuste de ph de películas de QCB y gelatina.</i> .....	<b>75</b>
<b>Tabla 12</b> <i>Resultados de viscosidad para cada película de qcb y gelatina.</i> .....	<b>79</b>
<b>Tabla 13</b> <i>Viscosidad de la muestra n°8 sin neutralizar, alternando el calentamiento en estufa.</i> <b>82</b>	

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> <i>Estructura química de la quitina.</i> .....	<b>24</b>
<b>Figura 2</b> <i>Reacción de desacetilación de la quitina para producir quitosano.</i> .....	<b>25</b>
<b>Figura 3</b> <i>Estructura química de la unidad de anhidroglucosa en la celulosa.</i> .....	<b>26</b>
<b>Figura 4</b> <i>Estructura de la piel humana.</i> .....	<b>30</b>
<b>Figura 5</b> <i>Ejemplo de DCC.</i> .....	<b>45</b>
<b>Figura 6</b> <i>Mapa de la ciudad de Latacunga indicando los lugares de obtención de residuos del camarón.</i> .....	<b>47</b>
<b>Figura 7</b> <i>Mapa de proceso de obtención de quitosano.</i> .....	<b>48</b>
<b>Figura 8</b> <i>Cáscaras de camarón secas.</i> .....	<b>49</b>
<b>Figura 9</b> <i>Polvo de cáscara de camarón.</i> .....	<b>49</b>
<b>Figura 10</b> <i>Mapa de proceso de obtención de celulosa bacteriana.</i> .....	<b>53</b>
<b>Figura 11</b> <i>Filtración al vacío.</i> .....	<b>55</b>
<b>Figura 12</b> <i>Extracción de quitosano.</i> .....	<b>61</b>
<b>Figura 13</b> <i>IR de muestra de quitosano.</i> .....	<b>62</b>
<b>Figura 14</b> <i>IR en función de absorbancia de quitosano extraído.</i> .....	<b>63</b>
<b>Figura 15</b> <i>Localización de valores de absorbancia del IR del quitosano extraído.</i> .....	<b>65</b>
<b>Figura 16</b> <i>Celulosa bacteriana extraída y secada.</i> .....	<b>67</b>
<b>Figura 17</b> <i>Espectro IR de celulosa bacteriana producida por Acetobacter Xilinum.</i> .....	<b>68</b>
<b>Figura 18</b> <i>Diagrama de caja de la distribución de pesos cada película formada de QC y gelatina.</i> .....	<b>71</b>
<b>Figura 19</b> <i>Muestra 8 y 12 sin glicerina y con glicerina.</i> .....	<b>71</b>
<b>Figura 20</b> <i>Diagrama de caja para la distribución de pesos de muestras de películas de QCB y gelatina.</i> .....	<b>73</b>

<b>Figura 21</b> <i>Gráfico de superficie de respuesta de fracción gel de películas de QC y gelatina.....</i>	<b>74</b>
<b>Figura 22</b> <i>Diagrama de caja de la fracción gel de cada matriz QCB y gelatina después del ajuste de pH. ....</i>	<b>75</b>
<b>Figura 23</b> <i>Diagrama de caja de fracción gel antes y después de ajuste de pH. ....</i>	<b>76</b>
<b>Figura 24</b> <i>Gráfico de superficie de respuesta después de ajuste de pH en las películas de QCB y gelatina. ....</i>	<b>77</b>
<b>Figura 25</b> <i>Comparación de respuesta de superficie de A) fracción después y B) antes de ajuste de pH. ....</i>	<b>78</b>
<b>Figura 26</b> <i>Diagrama de caja de viscosidades de hidrogeles de QCB y gelatina.....</i>	<b>80</b>
<b>Figura 27</b> <i>Viscosidad de muestra N°5 sin neutralizar. ....</i>	<b>81</b>
<b>Figura 28</b> <i>Gráfico de RSM de viscosidad de cada hidrogel de QCB y gelatina. ....</i>	<b>83</b>
<b>Figura 29</b> <i>Gráfico de superficie de respuesta, de viscosidad para un RMFG.....</i>	<b>84</b>
<b>Figura 30</b> <i>Análisis termogravimétrico de muestra de quitosano. ....</i>	<b>85</b>
<b>Figura 31</b> <i>Análisis termogravimétrico de muestra de celulosa bacteriana. ....</i>	<b>86</b>
<b>Figura 32</b> <i>Análisis termogravimétrico de película quitosano-celulosa bacteriana con gelatina (óptima). ....</i>	<b>88</b>
<b>Figura 33</b> <i>Comparación de análisis termogravimétrico de quitosano, celulosa bacteriana y película de QCB. ....</i>	<b>89</b>

**ÍNDICE DE ECUACIONES**

1. <i>Contenido de Humedad</i> .....	38
2. <i>Fracción Gel</i> .....	39
3. <i>DD Método IR 1</i> .....	42
4. <i>DD Método IR 2</i> .....	42
5. <i>DD Método IR 3</i> .....	42
6. <i>DD Método Titulación Ácido-Base</i> .....	43
7. <i>Rendimiento</i> .....	51
8. <i>Determinación del DD Método Titulación Ácido-Base</i> .....	52
9. <i>Determinación del DD Método IR 1</i> .....	64
10. <i>Determinación del DD Método IR 2</i> .....	64
11. <i>Determinación del DD Método IR 3</i> .....	64
12. <i>Determinación del DD IR Promedio</i> .....	65
13. <i>Determinación de Contenido de Ceniza del Quitosano</i> .....	86
14. <i>Determinación de Contenido de Ceniza de la Celulosa Bacteriana</i> .....	87
15. <i>Determinación de Contenido de Ceniza de Película QCB y Gelatina</i> .....	88

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**SCOBY:** *Colonia simbiótica de bacterias y levaduras.*

**CH<sub>3</sub>COOH:** *Ácido acético.*

**QCB:** *Quitosano-celulosa bacteriana.*

**IR:** *Infrarroja.*

**DD:** *Grado de desacetilación.*

**BC-ST:** *Cultivo estático.*

**FTIR:** *Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier.*

**TGA:** *Análisis termogravimétrico.*

**DTG:** *Análisis termogravimétrico diferencial.*

**RSM:** *Metodología de superficie de respuesta.*

**DCC:** *Diseño Central Compuesto.*

**NaOH:** *Hidróxido de sodio.*

**HCl:** *Ácido clorhídrico.*

**TG:** *Termogravimetría.*

**RMFG:** *Rango de la mejor fracción gel.*

**cP:** *Centipoise.*

**ml:** *Mililitro.*

## Resumen

En este estudio, se abordó la producción y optimización de películas de quitosano y celulosa bacteriana para su aplicación como hidrogel. Se utilizaron los exoesqueletos de camarón como materia prima para la producción de quitosano y un cultivo de *Acetobacter Xylinum* para obtener celulosa bacteriana. A través de un riguroso estudio de superficie de respuesta central compuesto, se variaron las concentraciones de quitosano, celulosa bacteriana y gelatina para determinar el rango óptimo de composición que maximizara la fracción gel y la viscosidad. Se observó un aumento significativo en la fracción gel, con un incremento del 10.98% tras un ajuste de pH ácido seguido de una neutralización, también se demostró una reducción significativa en la viscosidad del 94.1925% al calentar la muestra a una temperatura de 70 °C o más en presencia de sales. Se establece la mejor composición del diseño central compuesto de la cual presenta un 0.3848% para quitosano, 0.2675% de celulosa y 0.3477% de gelatina, además, se estableció un rango óptimo de composición que permitió obtener películas con valores elevados tanto de fracción gel como de viscosidad. Este estudio proporciona una base sólida para futuros trabajos en el desarrollo de hidrogeles eficaces para la regeneración de heridas y quemaduras.

*Palabras clave:* Hidrogel, biopelículas, celulosa bacteriana, quitosano, fracción gel, viscosidad.

## Abstract

In this study, the production and optimization of chitosan and bacterial cellulose films for hydrogel application was addressed. Shrimp exoskeletons were used as raw material for chitosan production and an *Acetobacter xylinum* culture was used to obtain bacterial cellulose. Through a rigorous composite core response surface study, concentrations of chitosan, bacterial cellulose and gelatin were varied to determine the optimal range of composition that maximized gel fraction and viscosity. A significant increase in gel fraction was observed, with an increase of 10.98% after acidic pH adjustment followed by neutralization, also a significant reduction in viscosity of 94.1925% was demonstrated when heating the sample to a temperature of 70 °C or higher in the presence of salts. The best composition of the composite core design is established which presents 0.3848% for chitosan, 0.2675% for cellulose and 0.3477% for gelatin, in addition, an optimal range of composition was established which allowed obtaining films with high values of both gel fraction and viscosity. This study provides a solid basis for future work in the development of effective hydrogels for wound and burn regeneration.

*Keywords:* Hydrogel, biofilms, bacterial cellulose, chitosan, gel fraction, viscosity.

## Capítulo I

### Generalidades

#### Introducción

En los últimos diez años se ha prestado una gran atención en la creación de biomateriales para el tratamiento de heridas, los cuales pueden venir en forma de hidrogeles, películas, espumas, parches transdérmicos, entre otras, donde se han utilizado biopolímeros en su desarrollo, dado que estos materiales brindan propiedades que en el área de la medicina resultan factibles (Iheaturu, 2019).

La celulosa bacteriana junto con el quitosano son biopolímeros que presentan propiedades antioxidantes y antimicrobianas, los cuales son naturales, biocompatibles y biodegradables (Alven, 2020). La celulosa bacteriana, junto con la quitina de la cual proviene el quitosano, son de los polímeros más abundantes en la naturaleza (De Masi, 2019).

La celulosa bacteriana y el quitosano presentan propiedades mecánicas y estructurales que se consideran adecuadas en su aplicación en la biomedicina, dado que puede imitar el tejido de la piel, individualmente la celulosa bacteriana brinda altas propiedades hidrófilas por lo que brinda hidratación constante a las heridas lo cual resulta beneficioso en los tratamientos médicos aplicados como apósito para heridas y andamiaje de tejido cutáneo (Kucińska-Lipka, 2015), por otra parte, el quitosano aporta una actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos lo que favorece a regeneración de tejidos (De Masi, 2019).

Se han realizado estudios sobre la preparación de películas de quitosano en combinación con biomateriales como alginato, colágeno, entre otros, que muestran una estabilidad frente a los cambios de pH, observándose buenos resultados en la

cicatrización de heridas (Yan, 2001), regeneración nerviosa (Berthod, 1996) y reconstrucción de tejidos, de esta forma favorecer a la remodelación de la matriz celular, dado que su forma que presenta similitud con la dermis normal de la piel (Gingras, 2003).

### **Justificación e Importancia**

Los residuos del camarón, con el incremento de su tasa de producción en las últimas décadas, donde hasta un 65% de unidad de camarón se lo puede categorizar como residuo en la industria alimenticia. La mala gestión de residuos del camarón implica el desaprovechamiento de los componentes presentes en estos residuos, donde entre un 40% y 35% son minerales y proteínas (Synowiecki y Al-Khateeb, 2003), un 14% y 30% de quitina (Pacheco N., 2009) y un cierto porcentaje de pigmentos donde destaca la astaxantina de la cual su cantidad extraída se aproxima a 248.48  $\mu\text{g/g}$  lo que se aproxima a un 0.025% de los residuos de camarón (Dave, 2020).

La buena gestión de este residuo para la obtención de quitosano resulta beneficioso a nivel ambiental e industrial, dado que permitiría su aplicación a la medicina u otras industrias como la industria alimenticia y a su vez reducirá el impacto ambiental al no ser considerado como desecho (Páez-Osuna, 2001).

Con respecto a la celulosa, puede ser originada de diferentes fuentes: origen vegetal, maderero y bacteriano. La celulosa bacteriana es la que presenta la mayor pureza, por siguiente, resulta más factible trabajar con este biomaterial a nivel investigativo e industrial. Dado a su flexibilidad, alta retención de agua, hidrofilia, cristalinidad y maleabilidad, este tipo de celulosa es óptima para aplicaciones médicas (Hussain, 2019).

La gestión de residuos industriales favorece a los factores económicos, sociales y medioambientales, lo que ha interesado a muchas industrias en la implementación de nuevas y rentables formas de gestión de residuos.

Residuos de biomasa producidos por las industrias agroalimentaria, cervecera, azucarera, textil y del papel son buenas fuentes para la producción de bajo costo de celulosa bacteriana, lo que aumentaría el potencial para su industrialización y comercialización a gran escala de este biopolímero (Hussain, 2019).

### **Alcance**

La implementación de celulosa bacteriana y quitosano en la medicina permite la realización de biomateriales útiles en la ingeniería de piel sintética para quemaduras, recubrimiento de heridas, fabricación de prótesis e implantes (Gorgieva, 2019) entre otras aplicaciones médicas.

Este estudio propone la formación de biopelículas de quitosano y celulosa bacteriana, que pueden tener beneficios ambientales y tener el potencial de conducir a aplicaciones médicas a través de la creación de biomateriales de valor agregado.

### **Objetivos**

#### ***Objetivo General***

- Optimizar las propiedades fisicoquímicas del hidrogel de quitosano y celulosa bacteriana mediante un diseño central compuesto.

#### ***Objetivos Específicos***

- Extraer quitosano a partir de exoesqueletos de camarón con un alto grado de desacetilación.
- Identificar celulosa bacteriana obtenida a partir del cultivo de *Acetobacter Xylinum*.

- Determinar los efectos de la proporción de quitosano y celulosa bacteriana en las propiedades fisicoquímicas del hidrogel.

### **Hipótesis**

El desarrollo de un hidrogel a base de quitosano y celulosa bacteriana, donde utilizando un agente reticulante específico, puede mejorar significativamente la fracción gel y la viscosidad del material final. Se espera que mediante la optimización de las proporciones de los componentes y la elección adecuada del agente reticulante, se pueda obtener un hidrogel con un alto porcentaje de fracción gel y una viscosidad adecuada para su uso en aplicaciones de regeneración de tejidos. Se llevará a cabo un análisis detallado de las variaciones en la fracción gel y la viscosidad en función de los cambios en las proporciones de quitosano y celulosa bacteriana y el agente reticulante utilizado, para identificar las combinaciones óptimas.

### **Variables de Investigación**

#### ***Variables Dependientes***

- Fracción gel.
- Viscosidad.

#### ***Variables Independientes***

- Tiempo.
- Temperatura.
- Concentración quitosano-celulosa-agente reticulante.

## Capítulo II

### Marco teórico

#### Polisacáridos

Un polisacárido son grandes cadenas de monosacáridos, los cuales a su vez son carbohidratos compuestos por unidades de azúcar, los cuales por su grupo funcional pueden ser aldosas o cetosas, donde se puede considerar polisacáridos cuando doce o más monosacáridos se encuentran unidos de forma directa unidos por enlaces glucosídicos que son puentes acetales que permiten esta unión entre monosacáridos. La configuración estructural de los polisacáridos ramificados pueden ser enlaces moleculares por medio de enlaces glucosídicos en los carbonos alfa-1,4 y en los carbonos alfa-1,6. Los polisacáridos son elementos estructurales que en la naturaleza cumplen con la función de almacenar energía y carbono para las plantas y animales (Tapia, 2020).

Los polisacáridos se pueden clasificar en función de las unidades que los componen, al darse de un mismo tipo de monosacáridos se los denomina homopolisacáridos y al conformarse por diferentes tipos de monosacáridos se los conoce como heteropolisacáridos. Con el tipo de polisacáridos se puede estimar algunas propiedades estructurales y funcionales, una de estas es la solubilidad la cual en los heteropolisacáridos son más solubles que los homopolisacáridos, y está determinada por su peso molecular (Xu, 2017). También se puede clasificar a los polisacáridos según su fuente biológica de procedencia como polisacáridos de plantas, animales, hongos, algas o de bacterias (Ullah, 2019).

En la naturaleza existe una extensa variedad de polisacáridos los cuales presentan diverso tipo de estructuras y funcionalidades, los polisacáridos al presentarse ampliamente en la naturaleza los convierte en recursos renovables que pueden llegar a ser utilizados de diferentes formas dependiendo de su biocompatibilidad,

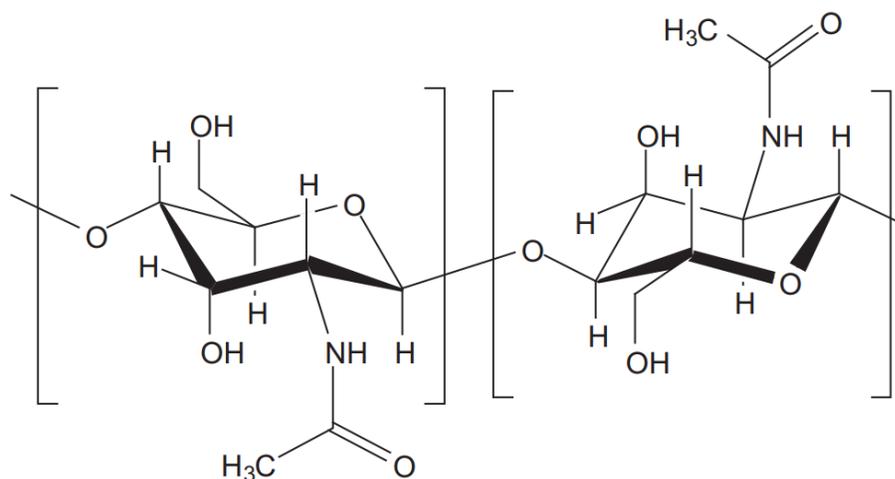
polifuncionalidad, estereoregularidad y otras cualidades que en los últimos años con la situación socioeconómica ha hecho que estos polímeros naturales sean sujeto de investigación para nuevas formas de aplicaciones (Barsett, 2005).

### **Quitina**

La quitina es un homopolímero de N-acetil-glucosamina (2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D- glucopiranososa) enlazados por enlaces  $\beta(1,4)$ . Es uno de los polisacáridos más abundante en la naturaleza, se encuentra distribuido en un rango amplio de seres vivos, como materia prima puede ser producido industrialmente por la extracción de exoesqueletos de crustáceos como cangrejo, camarones, langostas dado que en la industria alimenticia es una abundante fuente de quitina (Shalaby, 2017).

### **Figura 1**

*Estructura química de la quitina.*



*Nota.* Tomado de Williams, P. A. (Ed.). (2011). Renewable resources for functional polymers and biomaterials: polysaccharides, proteins and polyesters. Royal society of chemistry.

La quitina presenta tres formas polimorfas, la  $\beta$ -quitina, la  $\alpha$ -quitina y la  $\gamma$ -quitina, la cual es la combinación de  $\beta$ -quitina y  $\alpha$ -quitina (Kumirska, 2010), de las tres la más

estable es la  $\alpha$ -quitina dado que posee una gran dureza y se encuentra en las partes más rígidas del exoesqueleto de crustáceos mientras que la  $\gamma$ -quitina y  $\beta$ -quitina presentan mayor flexibilidad y se encuentran en las partes blandas y firmes de animales marinos como las plumas de un calamar (Garrido, 2017).

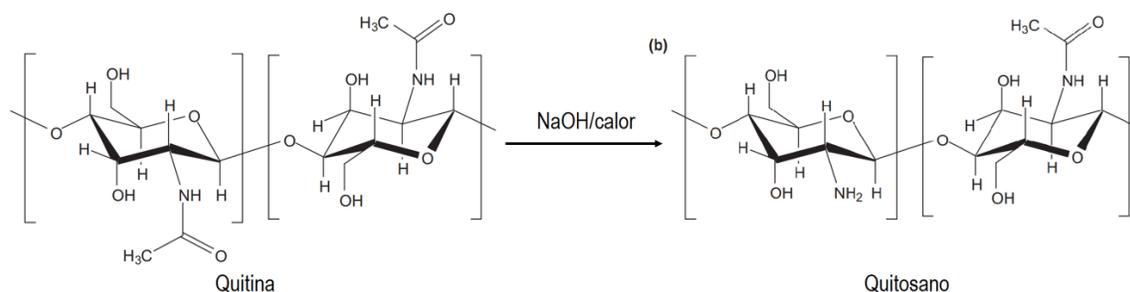
Para la extracción de la quitina se debe emplear un proceso mecano-químico que consiste en una etapa de trituración, desmineralización con ácido clorhídrico y desproteinización con NaOH (Singh, 2021).

### Quitosano

El quitosano es un copolímero de 2-amino-2-deoxi-beta-D-glucopiranososa (glucosamina) y 2-acetamida-2-deoxi-beta-D-glucopiranososa (N-acetilglucosamina) es obtenido por la desacetilación parcial o total de la quitina, se considera quitosano cuando los grupos de N-acetil es menor al 50% en su composición y es obtenido mediante la hidrólisis del grupo acetamida mediante un tratamiento alcalino que remueve proteínas y ocurre la desacetilación de la quitina a la vez (Shalaby, 2017). El quitosano mientras mayor sea su grado de desacetilación se vuelve más soluble en medio acuoso ácido, lo que le da la característica de poder formar geles, películas o fibras.

### Figura 2

*Reacción de desacetilación de la quitina para producir quitosano.*



*Nota.* Tomado de Shalaby, E. (Ed.). (2017). Biological activities and application of marine polysaccharides. BoD–Books on Demand.

El grado de desacetilación se puede determinar mediante algunas técnicas como la valoración potenciométrica (Balázs, 2007), espectroscopía infrarroja (Dimzon, 2015), análisis elemental, valoración conductimétrica (Dos Santos, 2009), reacción enzimática (Nanjo, 1991), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (Lavertu, 2003), entre otras.

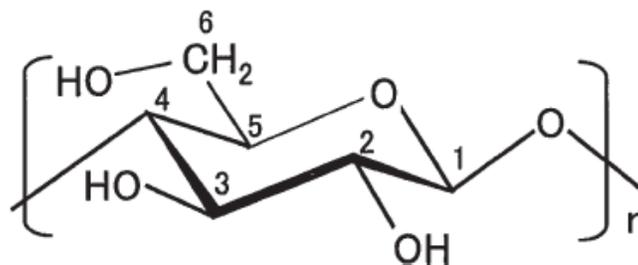
### ***Celulosa Bacteriana***

La celulosa bacteriana es un polisacárido producido por ciertos microorganismos de los géneros *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Sarcina* donde la más eficiente es la *Acetobacter xylinum*. (Jozala, 2015) y su producción se da en presencia de sacarosa o glucosa como fuentes de carbono para su crecimiento y la formación del polisacárido (Vandamme, 1998).

Al ser una molécula lineal compuesta por unidades repetidas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta(1-4)$  o anhidroglucosa (Phruksaphithak, 2019), posee una estructura cristalina que se caracteriza por la presencia de fibrillas, o hilos de celulosa, que corren paralelos entre sí. Se trata de un material biocompatible y biodegradable que se ha utilizado en diversos campos, como la medicina, la industria alimentaria y el medio ambiente (Islam, 2017).

### **Figura 3**

*Estructura química de la unidad de anhidroglucosa en la celulosa.*



La celulosa bacteriana se caracteriza por tener una alta pureza y una estructura cristalina única, lo que le confiere propiedades físicas y químicas especiales (Huang, 2014). Una de las propiedades más destacadas de la celulosa bacteriana es su elevada resistencia mecánica, lo que la convierte en un material ideal para la fabricación de dispositivos médicos y materiales de construcción (Nakagaito, 2005).

Además, la celulosa bacteriana tiene una alta capacidad de absorción de agua (Meftahi, 2010) y es resistente a la degradación por enzimas y microorganismos, lo que la convierte en un material adecuado para la conservación de alimentos y el tratamiento de residuos sólidos (Camargo, 2020).

### **Polisacáridos en la Medicina**

Existen muchas investigaciones que muestran los efectos de los polisacáridos en la salud humana, desde la actividad antiviral (Chen, 2018), actividad antioxidante (Zhong, 2019), hasta las actividades antitumorales de los polisacáridos (Xie, 2020) que respalda la utilización de una amplia gama de polisacáridos y sus derivados en la medicina.

### ***Actividades Biológicas de los Polisacáridos***

Desde la antigüedad se han utilizado en la naturaleza hierbas en la medicina tradicional, donde los principales responsables de los efectos medicinales son los polisacáridos que componen a estas hierbas medicinales (Barbosa, 2021), la bioactividad de estos polisacáridos tienen efecto sobre las respuestas inmunitarias del ser humano, tales como actividades antitumorales, antioxidantes hepatoprotectoras, antivirales, radio protectoras, antivirales y otras formas de estimular el sistema inmune (Ullah, 2019).

**Tabla 1**  
*Actividades biológicas de algunos polisacáridos.*

Actividad biológica	Polisacárido	Mecanismo
Actividad contra la obesidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\beta</math>-glucano</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reducción de la ingesta de energía.</li> <li>• Aumento de la plenitud y la saciedad.</li> <li>• Disminución del hambre.</li> </ul>
Actividad antidiabética	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\beta</math>-glucano</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suprime la formación de productos finales de glicación (AGE).</li> <li>• Reducción de las respuestas postprandiales de la glucosa y la insulina.</li> <li>• Aumenta el nivel de enzimas antioxidantes en el organismo.</li> </ul>
Actividad antioxidante	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fucoidan</li> <li>• Polygonum</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eliminación de radicales libres.</li> <li>• Previene la oxidación de lípidos y la glicación de proteínas.</li> <li>• Inhibe la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS).</li> </ul>
Actividad antitumoral	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sulfato de heparán</li> <li>• Pectina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limita la producción de prostaglandina E2.</li> <li>• Evita la oxidación del ADN.</li> </ul>

Actividad biológica	Polisacárido	Mecanismo
Actividad antitumoral	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sulfato de heparán</li> <li>• Pectina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimula a los macrófagos para que produzcan citoquinas ayudantes citoquinas de tipo 1 y 2 (Th1 y Th2).</li> <li>• Promueve la formación de complejos ternarios. Desplaza los factores de crecimiento.</li> </ul>

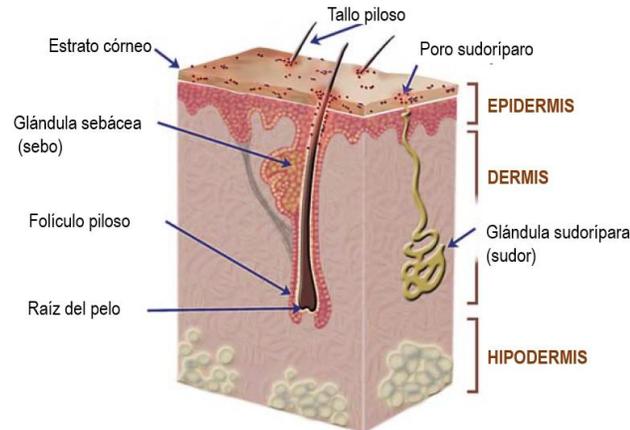
*Nota.* Tomado de: Ullah, S., Khalil, A. A., Shaukat, F., & Song, Y. (2019). Sources, extraction and biomedical properties of polysaccharides. *Foods*, 8(8), 304.

### **Biopolímeros en la Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa**

La piel humana es un órgano complejo que se encuentra constituida por tres capas (hipodermis, dermis y epidermis), las cuales brindan protección y control sobre las interacciones existentes con el entorno exterior. En la parte exterior de la epidermis se encuentra el estrato córneo, la cual es la capa protectora que se compone de células muertas que se desprenden regularmente de la superficie (Leid, 2009).

La mayoría de los microbios o microorganismos viven en el medio natural, solo un porcentaje menos del uno por ciento, logran invadir los tejidos humanos vivos, lo que provoca enfermedades, la temperatura corporal, los alimentos y agua presentes en el cuerpo humano son características para ofrecer un buen sitio para estos microbios (Leid, 2009).

**Figura 4**  
*Estructura de la piel humana.*



*Nota.* Tomado de Leid, J. G., & Shirtliff, M. (2009). The role of biofilms in device-related infections (Vol. 2, pp. 1-44). M. Shirtliff (Ed.). Berlin, Germany Springer.

En la capa externa de la piel están habitadas por residentes permanentes los cuales no crecen ni se multiplican en la piel (presentan un límite de multiplicación), el número de estos microorganismos impregnados en toda la piel se relaciona por las condiciones cutáneas tales como la actividad de las glándulas sebáceas y sudoríparas, donde las secreciones de estas glándulas brindan los nutrientes y condiciones favorables para que exista una determinada composición de microflora residente en la piel, externamente la piel no se ve afectada por esta microflora residente, dado que esta misma se encarga de prevenir la colonización de la piel por microorganismos patógenos, sin embargo, se pueden dar ciertas condiciones que hace que esta flora residente provoque enfermedades en la piel, por lo general estas afecciones suelen ser el resultado de lesiones en la piel las cuales proporcionan un nicho de crecimiento microbiano muy diferente del que se encuentra en la microflora microbiana (Scott, 2010).

El proceso de cicatrización de tejidos se encuentra en relación con la respuesta inmunitaria y la invasión de microbios, dado que en sistemas inmunitarios debilitados las

grandes poblaciones bacterianas retrasan la cicatrización de la piel, por siguiente, un sistema inmune o antimicrobianos favorece a una cicatrización (Leid, 2009).

Los biopolímeros son cada vez más importantes en el cuidado de heridas, su alto grado de biocompatibilidad y sus propiedades antimicrobianas, inmunomoduladores y angiogénicas crean un ambiente ideal para promover la cicatrización de heridas, como por ejemplo tenemos celulosa, alginato, ácido hialurónico, colágeno, quitosano, entre otros. Se han realizado diferentes avances tecnológicos en ciencia de materiales, medicina regenerativa, nanotecnología y bioingeniería con el fin de mejorar las características funcionales y estructurales de estos biopolímeros para satisfacer la demanda actual de cuidado de heridas, esto incluye reparación de tejidos, restauración de la integridad de tejidos y cicatrización de heridas sin formación de cicatrices (Sahana, 2018).

### ***Quitosano como Biopolímero Aplicado en la Medicina***

El quitosano se encuentra compuesto por cadenas de N-acetilglucosamina unidas por enlaces peptídicos, formando polisacárido lineal, el cual es biocompatible, biodegradable y no tóxico (Ramya, 2012). Estas propiedades lo hacen adecuado para su uso en aplicaciones biomédicas, como en el desarrollo de materiales para ingeniería de tejidos y en la liberación de fármacos de forma controlada (Pellá, 2018).

El quitosano también tiene propiedades antimicrobianas y se ha utilizado en la conservación de alimentos y en la fabricación de productos de higiene personal, como cremas y lociones (Sharkawy, 2020). Además, también se ha demostrado que puede tener un efecto beneficioso en la salud digestiva cuando se consume en forma de suplemento dietético (Le, 2015).

En medicina, el quitosano ha sido utilizado en el tratamiento de heridas, ya que promueve la cicatrización y tiene propiedades antiinflamatorias y analgésicas (Hu, 2022).

El quitosano también se ha implementado en el desarrollo de dispositivos de liberación de fármacos, como parches e implantes, debido a su capacidad de controlar la liberación de principios activos de manera prolongada (Santos, 2014).

### ***Usos de Celulosa Bacteriana en la Medicina***

La celulosa bacteriana es un material natural, biocompatible y biodegradable que se ha utilizado en diversos campos de la medicina, uno de los usos más destacados de la celulosa bacteriana es en la fabricación de dispositivos médicos, como suturas, parches de heridas y materiales de relleno dado que se ha demostrado que la celulosa bacteriana es capaz de promover la cicatrización y la regeneración de tejidos, por ende convierte la celulosa bacteriana en una opción atractiva para la medicina regenerativa (Carvalho, 2019). Además, la celulosa bacteriana se ha utilizado en la elaboración de medicamentos y vacunas, ya que permite la liberación controlada de fármacos en el cuerpo (Ullah, 2016).

Otro uso importante de la celulosa bacteriana en la medicina es en la fabricación de dispositivos de diagnóstico, como tiras reactivas para la detección de enfermedades (Teodoro, 2021).

### **Acetobacter Xylinum**

Acetobacter xylinum es una bacteria perteneciente al género Acetobacter, es un tipo de bacteria aerobia láctica, capaz de producir ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) a partir de etanol y oxígeno. En la producción de kombucha, esta bacteria se utiliza para convertir el azúcar en ácido acético, dióxido de carbono y etanol, lo que es responsable del sabor característico del kombucha y ayuda a conservar el producto final. Además de esto, esta bacteria también es capaz de producir celulosa bacteriana, la cual se acumula en la superficie del líquido formando una especie de película o "colonia" conocida como SCOBY (Colonia simbiótica de bacterias y levaduras) o también conocida como madre (Soares, 2021). La celulosa bacteriana es como un hogar para las bacterias y levaduras

del kombucha, proporciona un ambiente estable para su crecimiento, ayuda a mantener la consistencia del líquido y evitar la contaminación con microorganismos externos (Amarasekara, 2020).

Para cultivar *Acetobacter xylinum* se requieren compuestos orgánicos y minerales esenciales para el crecimiento y fermentación de las bacterias y levaduras. Para la producción de ácido acético, dióxido de carbono, etanol y celulosa bacteriana, es necesaria una fuente de carbono que permita a las bacterias y levaduras crecer y reproducirse. Según un estudio realizado por Tua en el 2017, se utiliza azúcar como fuente de carbono. La fermentación del azúcar produce ácido acético, dióxido de carbono, etanol y celulosa bacteriana. La producción de celulosa en el kombucha está regulada por la disponibilidad de azúcar y oxígeno en el ambiente (Tua, 2017).

Con una suficiente cantidad de azúcar disponible, las bacterias producirán celulosa para formar una colonia estable conocida como SCOBY. Con suficiente oxígeno disponible, las bacterias producirán celulosa en una tasa mayor. Sin embargo, si el azúcar o el oxígeno son limitados, la producción de celulosa puede verse afectada (Tua, 2017).

## **Hidrogel**

Los hidrogeles provienen de materiales poliméricos que pueden contener una gran cantidad de agua en su estructura, que puede llegar a ser del orden del 90%. Esta alta hidratación los hace muy similares a los tejidos biológicos, lo que los hace muy útiles en aplicaciones biomédicas y de ingeniería tisular. Además, dado a su alta capacidad de absorción de líquidos y una buena elasticidad, los hace útiles en productos de consumo y en la industria agrícola (Manzoor, 2012).

Existen diversos métodos para la producción de hidrogeles, que se pueden clasificar en tres categorías principales: métodos químicos, métodos físicos y métodos

biológicos (Li, 2020). Los métodos químicos incluyen técnicas como la polimerización por radicales libres, la polimerización por oxidación, la polimerización por adición y la polimerización por condensación (Green, 2010). Estos métodos se basan en la reacción química entre monómeros para formar polímeros con enlaces covalentes (Picchioni, 2018). Los métodos físicos incluyen técnicas como la gelificación por enfriamiento y la gelificación por reticulación, los cuales se basan en el cambio de estado de la solución o el coloidal para formar una red polimérica porosa (Yokoyama, 1986). Los métodos biológicos incluyen técnicas como la ingeniería de tejidos y la síntesis de polímeros por medio de microorganismos. Estos métodos se basan en el uso de células vivas o enzimas para sintetizar polímeros con enlaces no covalentes (Sakr, 2022).

Los hidrogeles se pueden fabricar a partir de polímeros naturales o sintéticos, y su estructura puede ser modificada para obtener propiedades deseadas. Por ejemplo, se pueden incorporar grupos funcionales para mejorar la adhesión a materiales (Jung, 2020) o la liberación controlada de fármacos (Rizzo, 2021).

Un ejemplo de aplicación de los hidrogeles es su uso como material de relleno en cirugías plásticas, ya que se pueden utilizar para rellenar áreas del cuerpo que hayan perdido volumen debido a envejecimiento o a una cirugía previa (Von Buelow, 2005). También se han utilizado en productos de cuidado personal, como toallitas húmedas y toallitas de bebé, debido a su alta capacidad de absorción (Abd Manan, 2021).

Mitura (2020) indica las ventajas y desventajas en el uso de hidrogeles en la industria cosmética, las cuales se presentan en la siguiente tabla.

**Tabla 2***Biopolímeros utilizados como hidrogeles en aplicaciones cosméticas.*

Biopolímeros	Ventajas	Desventajas
Kappa-carragenano	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Retiene el agua en la piel y el cabello.</li> <li>• Se utiliza como acondicionador del cabello.</li> <li>• Actúa como hidratante.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede causar inflamación.</li> <li>• Puede causar irritación.</li> </ul>
Goma xantana	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Soporta diferentes rangos de temperatura y valores de pH.</li> <li>• Propiedades acondicionadoras de la piel.</li> <li>• No tóxico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Causa irritación.</li> </ul>
Goma guar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mejora el estado del cabello y de la piel.</li> <li>• Evita la pérdida de agua.</li> <li>• Aumenta la vida útil del producto.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensibilidad alérgica.</li> </ul>
Pectina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fortalece la piel.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pectina de algunas fuentes puede ocasionalmente mostrar escasa capacidad de gelificación.</li> </ul>
Alginato	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Borra las arrugas finas.</li> <li>• Aumenta la elasticidad y fortalece la piel.</li> <li>• Refresca la piel.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El gel formado puede tener mal olor.</li> </ul>
Celulosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumenta la hidratación de la piel.</li> <li>• Minimiza la aparición de hiperpigmentación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muestra escasa compatibilidad con una matriz polimérica.</li> </ul>

Biopolímeros	Ventajas	Desventajas
Gelatina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mejora la salud de la piel.</li> <li>• Aporta firmeza a la piel.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede provocar reacciones alérgicas.</li> </ul>
Colágeno	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mejora la elasticidad de la piel.</li> <li>• Reduce las arrugas.</li> <li>• Aumenta la hidratación de la piel.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede causar necrosis cutánea local y respuestas inflamatorias.</li> </ul>
Ácido hialurónico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ayuda a reducir la visibilidad de las líneas de expresión y arrugas.</li> <li>• Proporciona una piel más tersa.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede provocar reacciones alérgicas.</li> <li>• Puede causar erupciones en la zona de aplicación.</li> </ul>
Quitosano	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antimicrobiano.</li> <li>• Antioxidante.</li> <li>• Suaviza la piel.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reticulación del gel de quitosano puede afectar propiedades intrínsecas del quitosano.</li> </ul>

*Nota.* Tomado de Mitura, S., Sionkowska, A., & Jaiswal, A. (2020). Biopolymers for hydrogels in cosmetics. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 31, 1-14.

### **Agentes Reticulantes**

Los agentes reticulantes son productos químicos que se utilizan para formar redes de polímeros a través de reacciones de reticulación. Estos agentes se agregan a soluciones de polímeros o coloides para formar hidrogeles, que son materiales elásticos porosos con alta capacidad de absorción de agua. Los reticulantes se dividen en dos categorías: agentes reticulantes bifuncionales y agentes reticulantes multifuncionales

(Ratner, 2004). Los agentes reticulantes bifuncionales tienen dos grupos reactivos que pueden reaccionar entre sí para formar enlaces covalentes y unir cadenas de polímeros (Park, 2011). Los agentes reticulantes multifuncionales tienen varios grupos reactivos que pueden reaccionar entre sí para formar redes poliméricas más complejas y fuertes (Wong, 2004).

Los agentes reticulantes se utilizan en diversos campos, como la medicina (Khunmanee, 2017), la industria alimentaria (Gerrard, 2002) y la ingeniería de tejidos (Lim, 2022). Además, se han desarrollado nuevos agentes reticulantes que son usados para la formación de hidrogeles con características especiales, como la liberación controlada de fármacos o la respuesta a estímulos externos (Paradee, 2012).

### **Caracterización de Biopelícula Quitosano-Celulosa Bacteriana**

La caracterización de biopelícula es un campo de investigación que se enfoca en estudiar las películas biológicas formadas por microorganismos y sus componentes en diferentes ambientes. En particular, las biopelículas quitosano-celulosa bacteriana (QCB) son un tipo de biopelícula formada por una mezcla de quitosano y celulosa producida por bacterias.

La caracterización de biopelículas QCB puede incluir el estudio de su estructura, composición química, resistencia mecánica y propiedades antimicrobianas. Además, se pueden investigar las condiciones ambientales que afectan su formación y crecimiento, así como su aplicación potencial en campos como la biotecnología, la ingeniería de materiales y la biomedicina.

### ***Contenido de Humedad***

Existen varios métodos para determinar el contenido de humedad de una muestra, algunos de los métodos básicos son:

- Método de pesada: consiste en pesar una muestra antes y después de ser sometida a condiciones de secado (Hofa, 2017).
- Método Karl Fischer: es un método químico que utiliza un reactivo específico llamado Karl Fischer para medir el contenido de agua en la muestra. El reactivo reacciona con el agua presente en la muestra y genera una corriente eléctrica que se mide y utiliza para calcular el contenido de humedad (Koch, 2007).
- Método de vaporización: es similar al método de pesada, pero en lugar de utilizar el secado al aire, se utiliza una fuente de calor para vaporizar el agua contenida en la muestra (Nielsen, 2010). El contenido de humedad se calcula mediante la fórmula:

$$\% \text{ humedad} = \frac{(\text{masa húmeda} - \text{masa seca})}{\text{masa húmeda}} \times 100 \quad (1)$$

De estos métodos se pueden presentar ventajas y desventajas, donde dependen de la naturaleza de la muestra y las condiciones experimentales específicas. Es importante también mencionar que es importante considerar las especificaciones de cada método para obtener una medición aceptable del contenido de humedad (Nielsen, 2010).

### ***Fracción Gel***

La fracción gel es un indicador utilizado en la fabricación de hidrogeles para determinar la proporción de polímero que ha alcanzado un estado de gelificación. Se mide dividiendo el peso del polímero en estado de gel entre el peso total del polímero. Este parámetro refleja la eficacia de la gelación y se utiliza para evaluar la calidad del hidrogel y su capacidad para retener líquidos. Se determina a través de un proceso de pesaje y medición de la cantidad de polímero en estado de gelación en relación con el polímero total.

$$\%GF = \frac{W_1}{W_0} \times 100 \quad (2)$$

Donde  $W_0$  es el peso inicial de la muestra y  $W_1$  es el peso de la muestra seca luego de gelificar.

### ***Espectroscopía Infrarroja***

La espectroscopía infrarroja es un método empleado para evaluar la absorción o emisión de radiación infrarroja por una muestra. La radiación infrarroja es un tipo de energía electromagnética con longitudes de onda más prolongadas que la luz visible, pero más cortas que las ondas de microondas. (Aenugu, 2011).

La espectroscopía IR se basa en el hecho de que diferentes moléculas absorben radiación infrarroja en longitudes de onda específicas, conocidas como bandas de absorción. Estas bandas de absorción son únicas para cada molécula y pueden ser utilizadas para identificar y caracterizar una molécula específica (Fiore, 2021).

Existen varios tipos de espectroscopía IR, como la espectroscopía IR de transmisión (Akhgar, 2020), la espectroscopía IR de reflexión total atenuada (Ramer, 2006) y la espectroscopía IR de espejos planos (Hiroaki, 2002). Cada uno de ellos tiene sus propias ventajas y desventajas y se selecciona en función del tipo de muestra y las condiciones experimentales específicas.

La espectroscopía IR es una herramienta valiosa en una variedad de campos, como la química (Haas, 2016), la farmacología (Crupi, 2002), la biología (Munck, 2007), la ingeniería de materiales (Fernández-Carrasco, 2012), la medicina (Correia, 2018), entre otros. En la química, se utiliza para identificar y caracterizar compuestos orgánicos e inorgánicos, en la farmacología se utiliza para analizar la estructura de los medicamentos y en la ingeniería de materiales se utiliza para evaluar la calidad de los materiales.

**Espectroscopía IR de Quitosano.** Dong (2001) en su estudio de determinación del grado de sustitución del N-acilato de quitosano mediante espectros IR, muestra la aplicación de espectroscopía IR en la determinación del grado de desacetilación (DD). A continuación, se muestra las bandas principales e interpretaciones de algunas muestras típicas de quitosano con diferentes DD.

**Tabla 3**

*Bandas características de quitosano de diferentes grados de desacetilación.*

DD (%)					Asignaciones
99.84	81.44	47.36	19.11	1.17	
3435	3436	3433	3443	3427	Estiramiento O-H
2921	2921	2923	2928	2926	Estiramiento CH <sub>2</sub> asimétrico y estiramiento CH <sub>3</sub> simétrico
2863	2870	2880	2879	2879	Estiramiento C-H
1660	1668	1655	1664	1663	banda I amida
1604	1602	-	-	-	Deformación N-H
1558	1558	1561	1560	1558	Banda II amida
1425	1430	1411	1420	1419	Flexión CH <sub>2</sub> y deformación CH <sub>3</sub>
1384	1381	1382	1379	1378	Deformación simétrica CH <sub>3</sub> y flexión CH
1327	1320	1318	1314	1312	Banda III amida y meneo de CH <sub>2</sub>
1154	1159	1156	1159	1158	Estiramiento de oxígeno en puente asimétrico
-	-	1114	1114	1115	Modo de estiramiento anular asimétrico en el plano
1078	1076	1070	1070	1069	Estiramiento C-O
1028	1029	1028	1028	1029	Estiramiento C-O
886	896	899	897	892	Estiramiento del anillo

*Nota.* Tomado de Dong, Y., Xu, C., Wang, J., Wang, M., Wu, Y., & Ruan, Y. (2001).

Determination of degree of substitution for N-acylated chitosan using IR spectra. *Science in China Series B: Chemistry*, 44, 216-224.

**Espectroscopía IR de Celulosa.** En un estudio realizado por Zhang (2018), se analizaron las características de conformación de la celulosa bacteriana mediante

espectroscopia IR. Se compararon los espectros IR de dos tipos de cultivo diferentes, cultivo estático (BC-ST) y cultivo por agitación (BCSK), y se encontró que ambos eran prácticamente iguales.

En los espectros se identificaron varios picos de absorción que sugieren la presencia de diferentes grupos funcionales en la celulosa bacteriana. En 3344, 1163, 1111 y 1060  $\text{cm}^{-1}$  se encontró la presencia de grupos hidroxilo (-OH). En 2916, 1420, 1336, 667 y 623  $\text{cm}^{-1}$  se detectó la presencia de grupos carbonilo (-CH<sub>2</sub>-, >CH- y CH). Además, en 1280 y 877  $\text{cm}^{-1}$  se encontró la presencia de un anillo C-O-C, y en 1235 y 1035  $\text{cm}^{-1}$  se encontró la presencia de un C-O-C lineal (Zhang, 2018).

Los resultados obtenidos sugieren que la espectroscopia IR es una herramienta valiosa para analizar las características de conformación de la celulosa bacteriana y para identificar los grupos funcionales que se encuentran en su estructura.

### ***Grado de Desacetilación***

El grado de desacetilación (DD) es un parámetro utilizado para medir la cantidad de grupos acetilo existentes en un polisacárido (Du, 2012), especialmente en el quitosano, y para evaluar su calidad y pureza. Además, también se utiliza para determinar la aplicabilidad del quitosano en diferentes industrias. El quitosano está compuesto principalmente por unidades de N-acetilglucosamina y glucosa, y el grupo acetilo en su estructura es el encargado de su solubilidad en medios ácidos y su insolubilidad en medios alcalinos (Park, 2003). El DD se refiere a la cantidad de grupos acetilo presentes en el quitosano y se calcula como un porcentaje de los grupos acetilo eliminados. Es crucial tener presente que el porcentaje de desacetilación tiene una relación directa con la solubilidad y la estructura del quitosano, lo que afecta su utilización en distintas industrias (Aider, 2010). Un alto DD se relaciona con una mayor solubilidad y estabilidad del quitosano, lo que lo hace más adecuado para su uso en aplicaciones farmacéuticas y

alimentarias, mientras que un bajo DD se relaciona con una menor solubilidad y mayor estabilidad en medios alcalinos, lo que lo hace más adecuado para su uso en aplicaciones industriales, como la producción de filmes y membranas (Zargar, 2015). Es importante destacar que el DD debe ser medido y considerado en la producción y uso del quitosano para asegurar su eficacia y eficiencia en las aplicaciones deseadas.

**Métodos de Determinación del Grado de Desacetilación.** Existe varios métodos para la determinación del DD, los más destacados son el método de Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y el método de titulación ácido-base.

**Método de Espectroscopia Infrarroja (IR).** Se lleva a cabo utilizando un espectroscopio infrarrojo (IR) en un rango de ondas de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . La tasa de desacetilación (DDA%) fue calculada a través de las ecuaciones propuestas por Dong (2001) para cada relación más adecuada de Absorción (banda sonda/banda de referencia)

$$\frac{A_{1560}}{A_{3430}} = -0.0057 DD + 0.7375 \quad (3)$$

$$\frac{A_{1655}}{A_{2920}} = -0.0144 DD + 1.9239 \quad (4)$$

$$\frac{A_{1655}}{A_{2880}} = -0.0139 DD + 1.8833 \quad (5)$$

Las ecuaciones 3, 4 y 5 muestran coeficiente de correlación (R) de 0.9816, 0.9811 y 0.9764 correspondientes para las mediciones de grados de desacetilación (Dong, 2001).

**Método de Titulación Ácido-Base.** Czechowska-Biskup (2012) propone que para medir el DD del quitosano se disuelve quitosano seco en una solución de ácido clorhídrico y agua desionizada, luego se valora la solución utilizando una solución de NaOH

mediante una bureta y al mismo tiempo midiendo el pH continuamente a lo largo de su valoración, donde al final se determina el DD del quitosano mediante la siguiente fórmula.

$$DD\% = (2.03) \frac{V_2 - V_1}{m + 0.0042(V_2 - V_1)} \quad (6)$$

Donde: DD % es el grado de desacetilación, V2 el volumen de NaOH gastado para alcanzar un pH 2.0, V1 es el Volumen de NaOH gastado para pH ajustar un pH de 6.0 y m es el peso de la muestra de quitosano.

### **Viscosidad**

La viscosidad es una propiedad física que mide la resistencia interna de un fluido al fluir. Es la medida de la oposición que un fluido ofrece al movimiento de un cuerpo que se mueve dentro de ella (Massey, 2018). La viscosidad se relaciona con la fricción interna de un fluido y su capacidad para transmitir esfuerzos de carga (Massey, 2018). La medición de la viscosidad se realiza utilizando un viscosímetro, existen varios tipos de viscosímetros, cada uno con su propia metodología de medición. Los viscosímetros más comunes son los de capilar, los de rotor y los de cuchara (Gupta, 2014).

La viscosidad tiene aplicaciones en una amplia variedad de campos, desde la industria alimentaria hasta la petroquímica. En la industria farmacéutica, la viscosidad se utiliza para medir la consistencia de los medicamentos líquidos y semisólidos (Doktorovova, 2009).

En general, la medición y control de la viscosidad es esencial en la mayoría de los procesos industriales para garantizar la calidad y la eficiencia en la producción.

### **Contenido de Ceniza**

El contenido de ceniza en un material se refiere a la cantidad de elementos no orgánicos presentes en él, estos elementos son generalmente minerales y metales y su contenido se determina mediante un proceso de combustión controlada. La ceniza se

obtiene quemando completamente una muestra del material en cuestión, y el residuo sólido resultante se pesa y se calcula como un porcentaje del peso original de la muestra (Ismail, 2017).

### ***Análisis Termogravimétrico***

El análisis termogravimétrico es un proceso en el que se evalúa una propiedad de un material en función del tiempo y la temperatura. Durante la realización de un análisis termogravimétrico, se mide la disminución en el peso de una muestra a la vez que la temperatura aumenta en condiciones controladas y en atmósferas específicas, de esta forma se obtienen los termogramas y las curvas del análisis termogravimétrico diferencial (DTG) (Alonso, 2009).

### ***Diseño Experimental***

El diseño experimental es un enfoque para la investigación científica que busca establecer la relación causal entre variables. Esto se logra mediante la manipulación intencional de una o más variables independientes (también conocidas como factores) y el registro de cambios en una o más variables dependientes. Los resultados obtenidos en estos experimentos son utilizados para establecer relaciones causales y para formar conclusiones sobre el comportamiento de las variables en cuestión (Kirk, 2012).

### ***Diseño Central Compuesto***

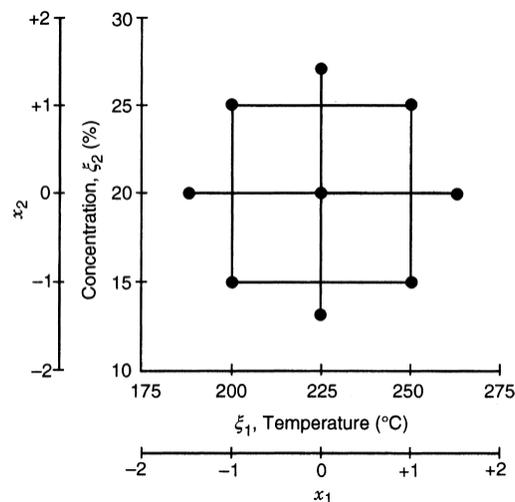
El diseño de central compuesto (DCC), también conocido como metodología superficie de respuesta (RSM) es un enfoque para la investigación experimental que se utiliza para optimizar una función de respuesta en función de varios factores independientes. Este tipo de diseño se utiliza a menudo en ingeniería, manufactura y ciencias de la vida, para optimizar la calidad de un producto o el rendimiento de un proceso.

En este tipo de diseño se establecen niveles para cada una de las variables independientes y se realizan mediciones en diferentes puntos de la superficie de respuesta, con el objetivo de encontrar la combinación óptima de niveles para maximizar o minimizar la función de respuesta (Khuri, 2010).

El DCC puede ser utilizado para optimizar una sola variable de respuesta o para trabajar con varias respuestas simultáneamente. Además de esto también se pueden incorporar restricciones en el diseño para asegurar que las variables independientes se mantengan dentro de ciertos límites (Khuri, 2010).

El DCC es uno de los diseños de superficie de respuesta más usados para ajustar modelos de segundo orden. Un diseño compuesto central consta de  $F$  puntos factoriales,  $2k$  puntos axiales ( $\pm\alpha$ ) y  $n_c$  puntos centrales (Myers, 2016).

**Figura 5**  
*Ejemplo de DCC.*



*Nota.* Tomado de Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons.

## Capítulo III

### Metodología

#### Equipos, Materiales y Reactivos.

##### *Equipos*

- Balanza analítica digital.
- Estufa de secado 115 litros ESCO Isotherm.
- pH-metro digital.
- Mufla.
- Espectrofotómetro de infrarrojo.
- Agitador magnético con calefacción.
- Rotavapor.
- Molino mecánico.

##### *Materia Prima*

- Cáscaras de camarón.
- *Acetobacter xylinum* (Kombucha).

##### *Materiales*

- Vasos de precipitación de 10, 100, 250, 400 y 600 ml.
- Papel filtro.
- Matraz Kitasato.
- Embudo buchner.
- Mortero.
- Matraces aforados de 250, 500 y 1000 ml.
- Vaso de vidrio de 1000 ml.

## Reactivos

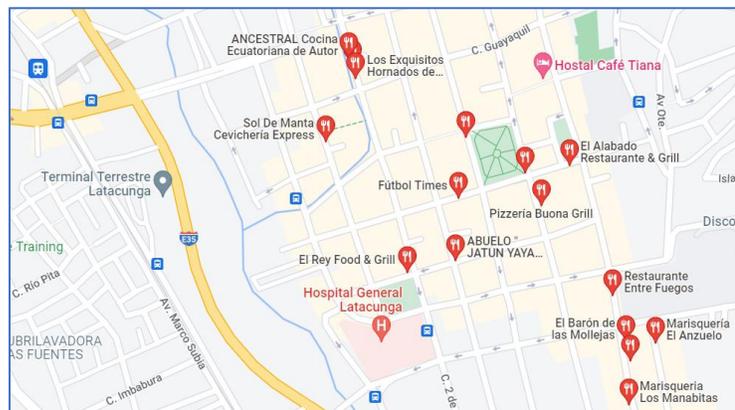
- Hidróxido de sodio (NaOH).
- Ácido clorhídrico (HCl).
- Ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH).
- Gelatina 300 bloom.
- Glicerina.
- Agua destilada.
- Azúcar morena.
- Té negro.

## Obtención de Residuo de Camarón

La obtención de las cáscaras de camarón se realiza a partir de solicitudes a varios locales de comida de la ciudad de Latacunga.

### Figura 6

Mapa de la ciudad de Latacunga indicando los lugares de obtención de residuos del camarón.



## Obtención de Acetobacter Xylinum

Se obtiene *Acetobacter xylinum* mediante de cultivos iniciadores, que son soluciones líquidas o polvos secos que contienen bacterias y levaduras vivas y activas. En su cultivo es necesario controlar factores como la temperatura, la acidez, la concentración

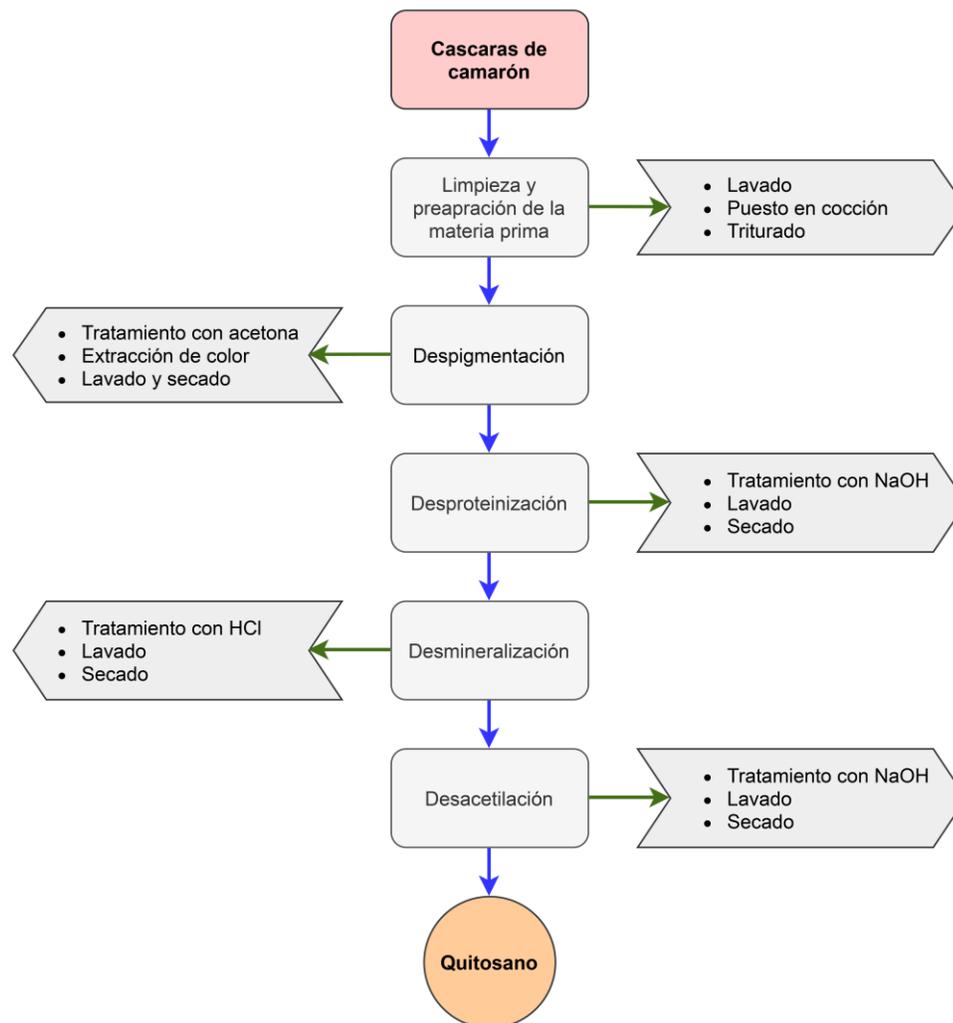
de azúcar y el tiempo de cultivo. Estas condiciones óptimas permiten el crecimiento y reproducción de las bacterias y levaduras, lo que a su vez aumenta la producción de celulosa. También es importante utilizar una colonia de kombucha sana y activa y asegurar una buena aireación del medio de cultivo.

### Proceso de Obtención de Quitosano

Para la obtención de quitosano a partir del residuo del camarón, se establece un proceso de cinco etapas: limpieza y preparación de materia prima, despigmentación, desproteínización, desmineralización y desacetilación.

#### Figura 7

Mapa de proceso de obtención de quitosano.



### ***Limpieza y Preparación de Materia Prima***

Los residuos de camarón son lavados, separando las cáscaras en un recipiente metálico y puestas a cocción a 100 °C, luego las cáscaras deben ser secadas en una estufa a 70 °C durante 18 horas y trituradas en un molino de café modelo Hamilton Beach.

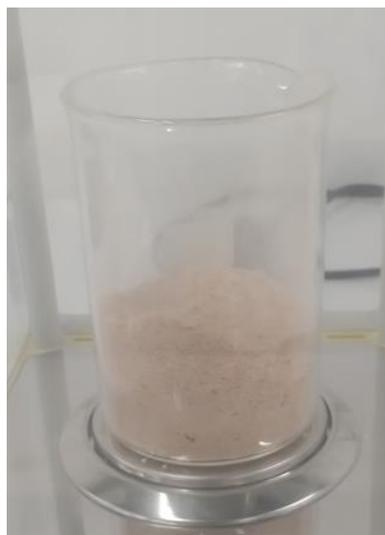
#### **Figura 8**

*Cáscaras de camarón secas.*



#### **Figura 9**

*Polvo de cáscara de camarón.*



### ***Despigmentación***

Para la decoloración del camarón se utiliza acetona en un matraz Erlenmeyer equipado con un tapón, con una relación al peso de polvo de cáscara de camarón de 1:5 p/v, durante agitación continua durante 2 horas, luego se deja reposar durante 18 horas sin quitar el tapón.

Luego del reposo, se filtra al vacío por medio de un matraz Erlenmeyer equipado con un embudo Büchner, recuperando el color y depositando el polvo de cáscara de camarón en un vaso de plástico de 1 litro, para realizar el correspondiente lavado, filtrado y secado a estufa a 50 °C durante 18 horas.

Para la extracción del pigmento se agrega almidón en polvo en relación 1:5 p/v en relación con el volumen de líquido. El color en solución de acetona y almidón se extrae mediante evaporación de la acetona en un rotavapor a 56 °C durante 1 hora, el polvo coloreado se lo recupera raspando el contorno del matraz de destilación.

### ***Desproteización***

La desproteización es un proceso utilizado para remover las proteínas de la muestra de cáscara de camarón para facilitar el proceso de obtención de quitosano.

El NaOH se utiliza para la desproteización debido a su capacidad para hidrolizar las proteínas en aminoácidos y péptidos, debido a su gran poder hidrolítico es capaz de hidrolizar los enlaces peptídicos que unen los aminoácidos en las proteínas (Chang, 2017).

En el proceso se utiliza NaOH al 50% en una relación 1:10 p/v de cáscara de camarón y solución de NaOH, con el fin de hidrolizar las proteínas en una solución acuosa mediante un tratamiento térmico a 80 °C en agitación continua durante dos horas, utilizando un agitador magnético con calefacción.

Luego se deja enfriar las cáscaras de camarón y se realiza lavados continuos hasta tener un ajuste de pH de 7. La muestra neutralizada es secada a 40 °C en una estufa durante 18 horas.

### ***Desmineralización***

Una vez neutralizada la muestra se prepara una solución de HCl al 10% en una relación sólido-solvente de 1:10 p/v, se deposita las cáscaras de camarón

El ácido clorhídrico se utiliza para disolver los minerales como carbonato de calcio y otras impurezas presentes en las cáscaras de camarón (Younes, 2016).

La muestra es neutralizada por medio de lavados sucesivos, una vez alcanzado un pH de 7 se seca la muestra en una estufa a 45 °C durante 18 horas, al final del proceso lo que se obtiene es quitina.

### ***Desacetilación***

La desacetilación es un proceso químico que se utiliza para eliminar los grupos de acetilo de una molécula orgánica (Kalut, 2008), para este caso de estudio es la quitina.

En el proceso de desacetilación se utiliza NaOH al 50% en una relación 1:10 p/v de quitina y solución de NaOH a temperatura ambiente con agitación continua durante 4 horas y 18 horas en reposo.

Luego se procede a realizar lavados sucesivos hasta alcanzar un pH de 7 y finalmente se seca en una estufa a 45 °C durante 20 horas.

Se puede estimar el rendimiento de obtención de quitosano en relación con la cáscara de camarón utilizada de la siguiente forma:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Cantidad de producto obtenido}}{\text{Cantidad de materia prima utilizada}} \times 100\% \quad (7)$$

### **Determinación de Grado de Desacetilación del Quitosano**

Para la determinación del DD se lo realiza por dos métodos, el primero por un análisis IR y el segundo por titulación ácido-base. A continuación, se explica el procedimiento del segundo método, dado que para el primer método no se requiere un proceso químico para la determinación del DD.

En este proceso, se toma una cantidad específica de quitosano seco (0.2 g) y se disolvió en una solución de HCl (0.1 M) y agua desionizada (solución de 25 ml), luego se agita durante un período de tiempo específico (30 min). Se añade más agua desionizada (25 ml) y se continúa agitando (30 min), hasta que el quitosano se disuelva completamente, luego se valora la solución utilizando una solución de NaOH (0.1 M) y por medio de una bureta se mide el volumen necesario para ajustar un pH de 2 y luego el volumen para un pH de 6. Finalmente, se determina los grados de desacetilación de la siguiente manera.

$$DD\% = (2.03) \frac{V}{0.2 + 0.0042(V)} \quad (8)$$

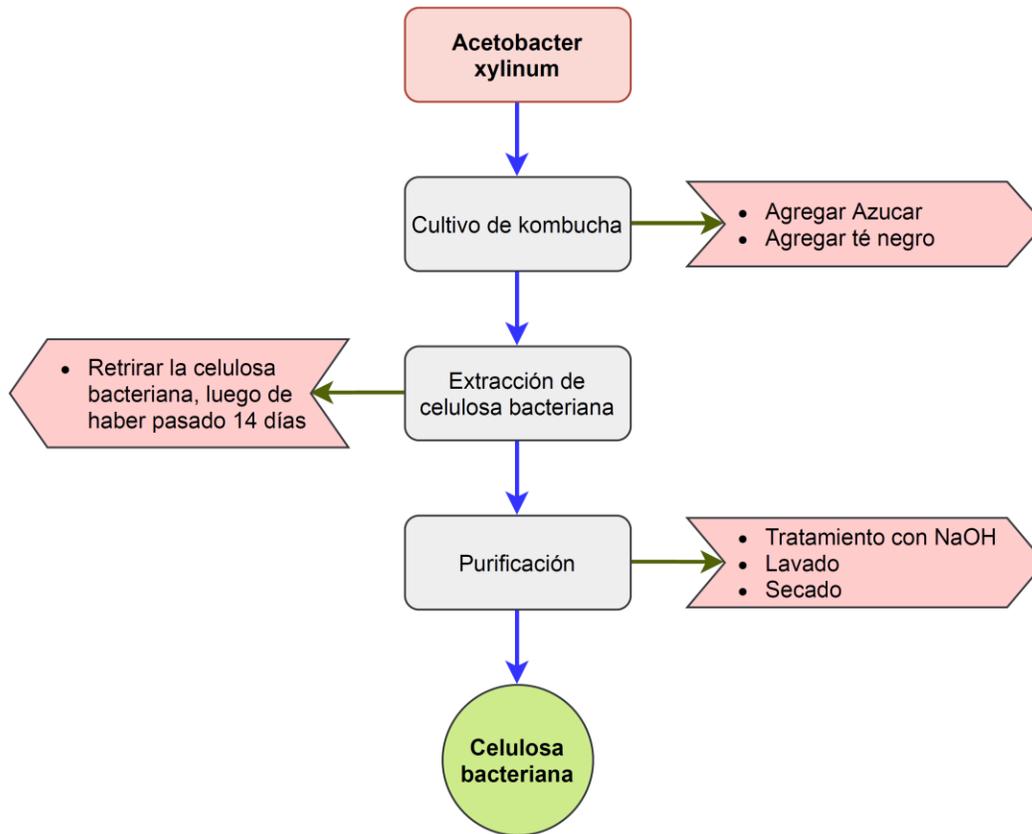
Donde V es la diferencia de volúmenes de valoración entre un pH de 2 y un pH de 6.

### **Proceso de Obtención de Celulosa Bacteriana**

Para la obtención de celulosa bacteriana a partir de la Kombucha (*Acetobacter xylinum*) se lo consigue mediante tres etapas: cultivo de kombucha, extracción de celulosa bacteriana y purificación.

**Figura 10**

Mapa de proceso de obtención de celulosa bacteriana.



### **Cultivo de Acetobacter Xylinum**

Para cultivar *Acetobacter xylinum* (la bacteria utilizada para producir kombucha), se necesitan los siguientes ingredientes: té, azúcar, un SCOBY y un ambiente cálido y sin contaminación. El cultivo se la realiza en el siguiente orden:

1. Se prepara el té: se hierve agua y se añade el té (puede ser té verde o té negro) y se deja enfriar.
2. Se añade azúcar: se añade azúcar al té para que las bacterias tengan alimento.
3. Se añade el SCOBY: se coloca el SCOBY en el té con azúcar.

4. Se tapa y se deja fermentar: se tapa el recipiente con un paño o gasa y se deja en un lugar aislado y oscuro durante un mes.
5. Cada semana se realiza una revisión del estado del cultivo y manteniéndolas condiciones óptimas, aireando el recipiente y añadiendo azúcar y té.

Es importante tener en cuenta que el proceso de fermentación puede variar dependiendo de las condiciones ambientales y de las preferencias personales. También es importante seguir medidas de higiene adecuadas para evitar contaminaciones.

### ***Extracción de Celulosa Bacteriana***

Para la extracción de la celulosa bacteriana, en las primeras semanas de haber formado la matriz madre de celulosa bacteriana, se comenzará a crear películas de celulosa bacteriana en la superficie del recipiente, cada 14 días se retira esa película formada. Para este proceso de extracción es requerido guantes de látex nuevos para evitar la contaminación del cultivo. El tamaño, grosor y dureza de la película dependerá de condiciones de fermentación del cultivo.

### ***Purificación de Celulosa Bacteriana***

La celulosa bacteriana extraída es tratada con NaOH al 10% en una relación de celulosa bacteriana de 1:5 a 80 °C durante una hora, de esta forma se asegura eliminar las bacterias e impurezas presentes en la celulosa bacteriana. Luego de cada purificación, se filtra al vacío la celulosa bacteriana y es conservada en un vaso de precipitado de 500 ml, se añade agua destilada lo suficiente para cubrir la celulosa bacteriana y se sella con Parafilm.

### ***Neutralización, Secado y Pulverizado***

Luego de repetir los procesos de extracción y purificación de celulosa bacteriana y tener una cantidad considerable de celulosa bacteriana, se procede a realizar lavados

continuos hasta alcanzar un pH neutro, luego es filtrado al vacío, secado a 50 °C durante 18 horas y pulverizado en un molino de café modelo Hamilton Beach.

Se agrega agua destilada al envase del molino y se deposita en un vaso de precipitación y se vuelve a secar en la estufa a 50 °C durante 18 horas.

### ***Procesos de Lavado Continuo***

Para todos los procesos (obtención de quitosano y celulosa bacteriana) que alteraban el pH se colocaba la muestra en un recipiente de 1 L para cada lavado, se utilizó un embudo Buchner equipado con papel filtro colocado en un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío.

**Figura 11**  
*Filtración al vacío.*



### ***Películas de Quitosano y Celulosa Bacteriana para Análisis IR***

Se toma 0.1 gramos para cada polisacárido y se agrega 10 ml de CH<sub>3</sub>COOH al 4%, cada solución separada de quitosano y celulosa son colocadas en moldes de plástico resistente al calor y son introducidas a la estufa a 70 °C durante 18 horas. Las películas formadas son analizadas en un espectrómetro IR en un rango de 600 a 4000 cm<sup>-1</sup>.

### **Contenido de Humedad**

Para la determinación de contenido de humedad se toma 1 gramo de cada polisacárido obtenido (Debe haber reposado en un recipiente abierto) y se pone a secar en una estufa a 100° C durante 3 horas y hasta que su peso no varíe, por último, se toma el valor de su peso y procede a determinar la humedad con la ecuación (1).

### **Proceso para el Desarrollo de Biopelículas de Quitosano-Celulosa Bacteriana**

Una vez de haber obtenido quitosano y celulosa bacteriana en una cantidad considerable, se procede a realizar las biopelículas de QCB.

Se agrega quitosano a una solución de gelatina (agente reticulante) en agitación continua durante 20 minutos, luego se agrega celulosa bacteriana en agitación continua durante 20 minutos y por último se agrega 0.5 ml de glicerina, se deposita la mezcla en un recipiente plástico termoestable y se seca en una estufa a 80° durante 18 horas.

### **Diseño Central Compuesto**

Se propone el siguiente DCC para evaluar la composición de la biopelícula de QCB.

**Tabla 4**

*Combinaciones de quitosano, celulosa bacteriana y gelatina para la producción de biopelículas.*

N° Muestra	Masa de quitosano (g)	Masa de celulosa (g)	Contenido de gelatina (g)	Masa de glicerina (g)	Total (g)
1	0.5899	0.4100	0.1158	1.2600	2.3759
2	0.5899	0.4100	0.3245	1.2600	2.5845
3	0.5899	0.4100	0.5330	1.2600	2.7930
4	0.1798	0.8201	0.0989	1.2600	2.3589
5	0.3000	0.7000	0.2400	1.2600	2.5000
6	0.3000	0.7000	0.0900	1.2600	2.3500
7	0	0	1.0000	1.2600	2.2600

N° Muestra	Masa de quitosano (g)	Masa de celulosa (g)	Contenido de gelatina (g)	Masa de glicerina (g)	Total (g)
8	1.0000	0	0.5500	1.2600	2.8100
9	1.0000	0	0.8500	1.2600	3.1100
10	0	0	1.0000	1.2600	2.2600
11	0.1798	0.8201	0.5500	1.2600	2.8100
12	0.5899	0.4100	0.5330	1.2600	2.7930
13	0.5899	0.4100	0.3245	1.2600	2.5845

En la Tabla 4 se muestra las combinaciones de composición de la biopelícula que se establecieron para su estudio, donde se emplea glicerina como agente reticulante, las posibles combinaciones se analizan en un DCC ajustado en dos factores y dos respuestas.

Los factores en tomar en cuenta en el diseño de composición centran son la masa de quitosano y de gelatina, donde se establece un valor de 1 gramo para la mezcla de QCB, entonces la composición de celulosa bacteriana queda sobreentendida si se establece en porcentaje, por otro lado, la gelatina también se ajustará a valores de porcentaje tomando a 1 gramo como su máximo, el cual será porcentual a la cantidad de la mezcla de QCB.

Se hace una exclusión en el contenido de celulosa en casos donde solo existe quitosano o solo existe gelatina, en estos casos la cantidad de celulosa será nula. Las respuestas de este diseño central a evaluar son la fracción de gel y la viscosidad. Entonces el DCC queda establecido de la siguiente forma:

**Tabla 5**

*Diseño central compuesto para la formación de biopelículas de quitosano y celulosa bacteriana.*

Orden de corrida	Contenido de quitosano (%)	Contenido de gelatina en la mezcla QCB (%)	Respuesta: Fracción Gel	Respuesta: Viscosidad
7	0.5899	0.1159	RA 01	RB 01
9	0.5899	0.3245	RA 02	RB 02
12	0.5899	0.5330	RA 03	RB 03
5	0.1799	0.0989	RA 04	RB 04
3	0.3000	0.2400	RA 05	RB 05
1	0.3000	0.0900	RA 06	RB 06
10	0	1.0000	RA 07	RB 07
6	1.000	0.5500	RA 08	RB 08
4	1.000	0.8500	RA 09	RB 09
11	0	1.0000	RA 10	RB 10
2	0.1799	0.5500	RA 11	RB 11
8	0.5899	0.5330	RA 12	RB 12
13	0.5899	0.3245	RA 13	RB 13

En la Tabla 5 se muestra el orden de corrida de cómo se va a realizar experimentalmente cada proceso para el desarrollo de biopelículas de quitosano-celulosa bacteriana.

### ***Biopelículas de Quitosano-Celulosa Bacteriana en Agua***

Se desarrollan las biopelículas en medio acuoso a pH neutro. Se realiza la recolección de cada componente mostrado en la Tabla 4. La gelatina se deposita en 50 ml de agua destilada, luego se añade quitosano, después se añade celulosa bacteriana, por último, se añade glicerina (agente reticulante), cada vez que se añade un componente al agua destilada debe estar en agitación continua durante 5 minutos, al final cada grupo de mezcla se coloca en recipientes plásticos enumerados según el orden de corrida del DCC

y son secados en una estufa a 70 °C durante 18 horas, cabe resaltar que debe respetarse el orden de preparación de cada mezcla.

### ***Biopelículas de Quitosano-Celulosa Bacteriana Ajustando el pH***

Se desarrollan las biopelículas de QCB ajustando el pH hasta alcanzar un pH ligeramente ácido. Se prepara cada componente según la Tabla 4. A 20 ml de agua destilada se le añade la gelatina, luego se le añade el quitosano, después la celulosa bacteriana, seguido de añadir glicerina y a la mezcla se le agrega 10 ml de CH<sub>3</sub>COOH al 4%, cada vez que se agrega un componente se debe hacer en agitación continua cada 5 minutos, luego de conseguir una mezcla homogénea se neutraliza la solución agregando 5 ml de NaOH 0.5 Molar.

Se coloca cada mezcla según el orden de corrida en cada recipiente enumerado, se deja secar en una estufa a 70 °C durante 18 horas.

Luego de este paso se forma el hidrogel de QCB, recuperando la película formada, pulverizándola y mezclándola en agitación continua (30 min) en 20 ml de agua destilada y 10 ml de CH<sub>3</sub>COOH (4%) y después neutralizando en 5 ml NaOH (0.5 M).

### ***Medición de Viscosidad de Hidrogeles a Base de Películas de Quitosano y Celulosa Bacteriana***

Para la determinación de viscosidad se utilizará un viscosímetro rotatorio de marca PCE modelo PCE-RVI 2 V1L, el cual consta de varios husillos empleados para diferentes rangos de viscosidad. El procedimiento del uso del equipo es el siguiente.

1. Se prende el viscosímetro y se asegura que no esté equipado con ningún husillo.
2. Se calibra el equipo.
3. Se ajusta el equipo, el husillo que se va a utilizar y las revoluciones por minutos del rotor (ambos definirán el rango de viscosidad).

4. Se coloca la muestra evitando la formación de burbujas, ajustando el nivel del husillo con el fluido en la línea de ajuste y se da paso al funcionamiento del equipo.

La viscosidad medida debe permanecer constante en el tiempo y luego debe ser anotada. La preparación de la muestra para el viscosímetro rotatorio es la siguiente:

1. Colocar los hidrogeles en vasos 250 ml
2. Agitar continuamente durante 20 minutos y dejar al aire libre durante 15 minutos.

### **Análisis Termogravimétrico**

Se llevó a cabo un análisis termogravimétrico utilizando un analizador termogravimétrico Perkin Elmer, modelo Pyris 1. El equipo fue regulado con un flujo de nitrógeno de 20 ml/min. Las muestras (quitosano, celulosa bacteriana y QCB con gelatina) fueron sometidas a un proceso de calentamiento, que comenzó a 50 °C y terminó en 975 °C. La temperatura se mantuvo en 50 °C por 1 minuto antes de iniciar el aumento gradual. Desde 50 °C hasta 600 °C, la temperatura subió 10 °C por minuto, y desde 600 °C hasta 975 °C, el aumento fue de 25 °C por minuto. Finalmente, se mantuvo la temperatura en 975 °C por 3 minutos. Cada análisis tomó un total de 1 hora y 14 minutos, incluyendo el tiempo necesario para registrar las curvas de termogravimetría (TG) y termogravimetría diferencial (DTG).

## Capítulo IV

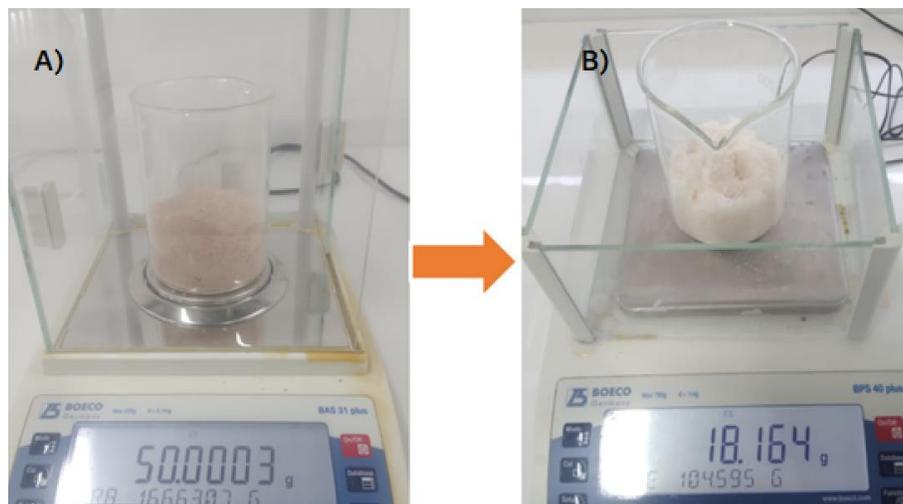
### Resultados y Discusión

#### Obtención de Quitosano

La cantidad en gramos de quitosano obtenido a partir de cáscara de camarón se muestra a continuación.

#### Figura 12

*Extracción de quitosano.*



*Donde A) son los gramos de cáscara de camarón y B) son los gramos de quitosano.*

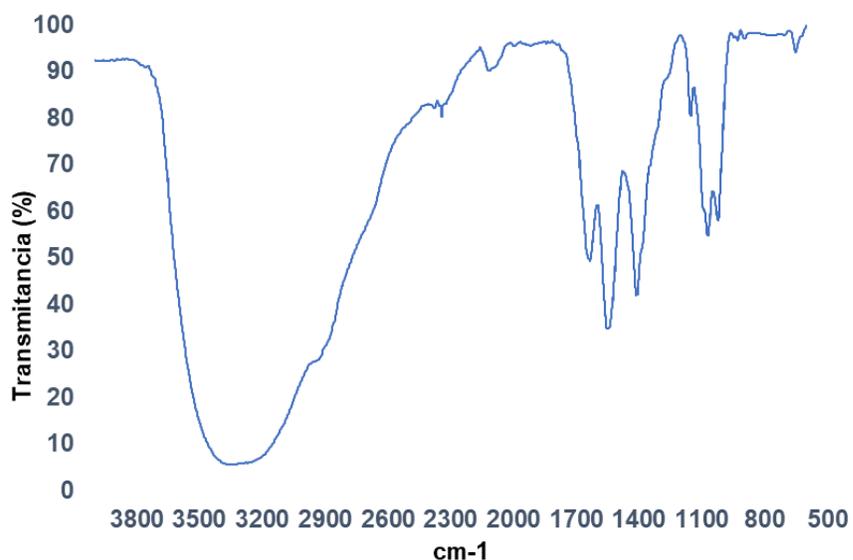
En la Figura 12 se puede observar que se obtuvo 18.164 gramos de quitosano en relación con los 50.0003 gramos de cáscara de camarón pulverizada, empleando la ecuación (7) se tiene un rendimiento de obtención de 36.3278 %, de este resultado se puede inferir que un rendimiento en la obtención de quitosano a partir de cáscara de camarón es considerado bajo en comparación con los estándares industriales. Sin embargo, es importante considerar las condiciones específicas del proceso y la calidad del producto final al evaluar la viabilidad del proceso, dado que un bajo rendimiento puede ser compensado por un alto grado de pureza de quitosano.

### ***Espectroscopia Infrarroja (IR) de Quitosano***

Se identifica la obtención de quitosano mediante IR, utilizando un espectrofotómetro. Todos los espectros se registraron a temperatura ambiente con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y un barrido de 20 veces. El resultado del IR mostró una gráfica de transmitancia (%) en función de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

#### **Figura 13**

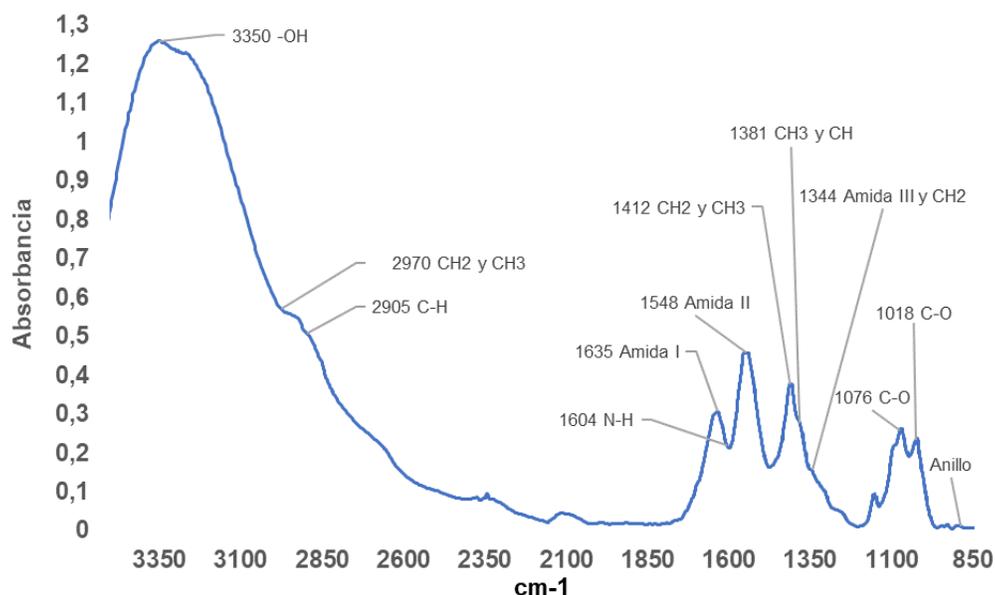
*IR de muestra de quitosano.*



En la Figura 13 se muestra el resultado del IR del quitosano extraído, donde está expresado en transmitancia, para realizar el análisis de identificación de las vibraciones de grupos funcionales, es requerido expresar los valores de transmitancia en absorbancia. Se muestra la gráfica de IR en función de la absorbancia mostrando la presencia de los grupos funcionales pertenecientes al quitosano a continuación.

**Figura 14**

IR en función de absorbancia de quitosano extraído.



En el espectro del IR del quitosano (Figura 14) se identificó las bandas características de los grupos funcionales que componen al quitosano, los cuales según su número de onda se mencionan a continuación.

- En  $3350 \text{ cm}^{-1}$  se encuentra el estiramiento O-H.
- En  $2970 \text{ cm}^{-1}$  se identifica el estiramiento  $\text{CH}_2$  asimétrico y estiramiento  $\text{CH}_3$  simétrico.
- En  $2905 \text{ cm}^{-1}$  se interpreta como el estiramiento C-H.
- En  $1604 \text{ cm}^{-1}$  se identifica la deformación de N-H o flexión.
- En  $1635 \text{ cm}^{-1}$  se identifica la tensión de amidas primarias.
- En  $1548 \text{ cm}^{-1}$  se identifica la tensión de amidas secundarias.
- En  $1412 \text{ cm}^{-1}$  se interpreta como la flexión de  $\text{-CH}_2\text{-}$  y flexión de deformación de  $\text{-CH}_3\text{-}$ .
- En  $1381 \text{ cm}^{-1}$  se identifica la deformación simétrica  $\text{-CH}_3$  y flexión CH.

- En  $1344\text{ cm}^{-1}$  se identifica la presencia de amida terciaria y agitación de  $\text{CH}_2$ .
- En  $1073$  y  $1018\text{ cm}^{-1}$  se identifica el estiramiento C-O.
- En  $890$  se identifica una débil señal de estiramiento del anillo de glucosamina.

La identificación de las bandas características de los grupos funcionales presentes en el quitosano, según Dong (2001) la presencia de deformación de N-H y la ausencia de señal en  $1114\text{ cm}^{-1}$  (modo de estiramiento anular asimétrico en el plano, característico de la quitina) indicaría que el DD del quitosano puede estar en un rango de  $81.44$  y  $99.8\%$  aproximadamente.

### **Grado De Desacetilación Del Quitosano**

Se emplea dos métodos para la determinación del DD, el primero empleando los resultados de IR del quitosano (Dong, 2001) y el segundo mediante la titulación ácido-base descrito por Czechowska-Biskup (2012).

**Método IR.** El Método Analizando El IR Del Quitosano Extraído Se Determina Analizando La Absorbancia Y Se Calcula Con El Promedio De Las Ecuaciones (3), (4) Y (5), Despejando DD, Como Se Muestra A Continuación.

$$\%DD_1 = \frac{\left(\frac{A_{1560}}{A_{3430}} - 0.7375\right)}{-0.0057} \quad (9)$$

$$\%DD_2 = \frac{\left(\frac{A_{1655}}{A_{2920}} - 1.9239\right)}{-0.0144} \quad (10)$$

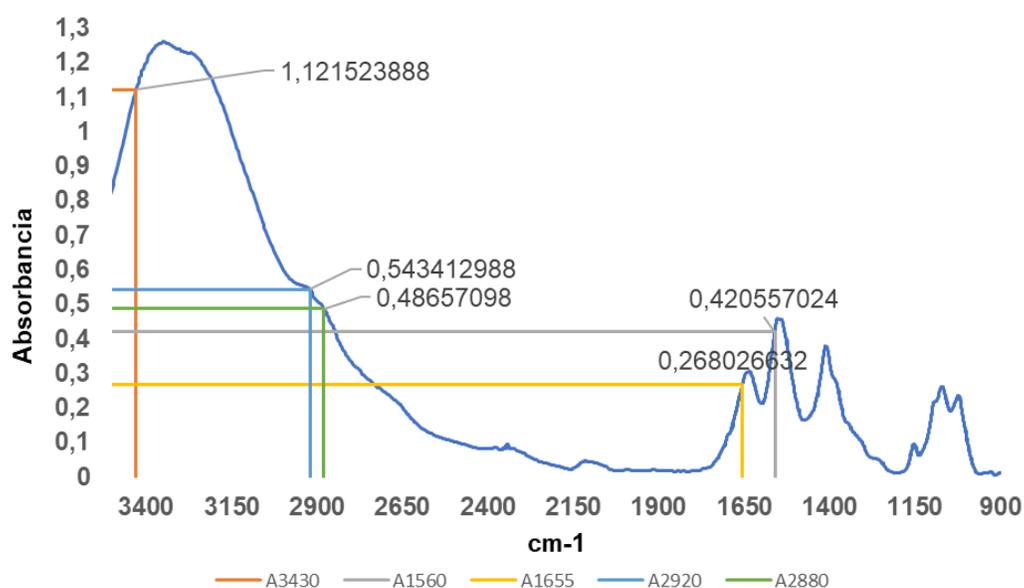
$$\%DD_3 = \frac{\left(\frac{A_{1655}}{A_{2880}} - 1.8833\right)}{-0.0139} \quad (11)$$

$$\%DD = \frac{\%DD_1 + \%DD_2 + \%DD_3}{3} \quad (12)$$

Se determina los valores de absorción de A1560, A3430, A1655, A2920 y A2880, empleando los resultados del IR en función de absorbancia de la Figura 13. Se visualiza los valores de absorción en la siguiente figura.

### Figura 15

Localización de valores de absorbancia del IR del quitosano extraído.



En la Figura 15 se observa los diferentes valores de absorbancia para las diferentes bandas de número de onda, los cuales son necesarios para la estimación del DD, se puede apreciar que la mayoría de los puntos coinciden con los picos del espectro localizados en la Figura 14, entonces en la determinación del DD relaciona la banda de amida secundaria con la banda de -OH y la banda de amida primaria con el estiramiento C-H. Los valores de absorbancia encontrados en la Figura 15 se encuentran en la siguiente tabla.

**Tabla 6**

Valores de absorbancia necesarios para la determinación del grado de desacetilación del quitosano.

Banda de Absorción (cm-1)	Absorbancia
A1560	0.4205
A3430	1.1215
A1655	0.2680
A2920	0.5434
A2880	0.4866

Con los valores de absorbancia (Tabla 6) se determinó el DD promedio, el resultado de dicho valor se encuentra a continuación.

**Tabla 7**

Resultado de grado de desacetilación empleando el método IR.

Fórmula	Grado de desacetilación (%)	Grado de desacetilación promedio (%)
$\%DD = \frac{(A_{1560} - 0.7375)}{-0.0057}$	63.5987	
$\%DD = \frac{(A_{1655} - 1.9239)}{-0.0144}$	99.5750	86,4960
$\%DD = \frac{(A_{1655} - 1.8833)}{-0.0139}$	96.3143	

**Método Titulación Ácido-Base.** De la titulación ácido base se visualizó una diferencia de volumen en la bureta de 9.78 ml (v) cuando se valoró los 0.2 gramos de quitosano para un ph de 2 y de 6, entonces se reemplaza en la ecuación (8).

$$DD\% = (2.03) \frac{9.78}{0.2 + 0.0042(9.78)} = 82.3532 \%$$

El DD de la muestra de quitosano extraído de la cáscara de camarón oscila entre un 63.59% y un 86% (Método IR y titulación ácido-base), con un promedio de 85.46%. No HK (1995) establece que el DD del quitosano oscila entre el 56% y el 99%, con una media del 80%, por siguiente se puede considerar que el quitosano obtenido tiene una buena calidad en términos de DD.

### **Obtención De Celulosa Bacteriana**

Se obtuvo 5.090 gramos de celulosa bacteriana, durante un mes de extracción continua de celulosa bacteriana del cultivo de "Acetobacter xylinum". Se estima una producción de 0.17 gramos de celulosa bacteriana por día.

### **Figura 16**

*Celulosa bacteriana extraída y secada.*



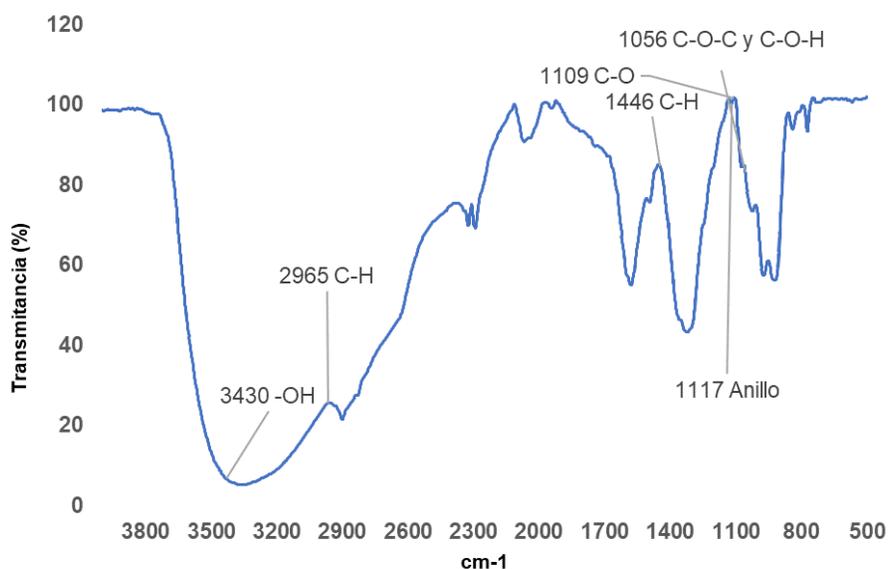
El peso de la celulosa bacteriana disminuye significativamente durante su tratamiento y luego de haberse secado se pierde su propiedad de absorción de agua. Estos se pueden ver reflejando en la determinación de contenido de humedad.

### ***Espectroscopía Infrarroja (IR) De Celulosa Bacteriana***

El resultado del análisis de espectroscopia infrarroja de celulosa bacteriana producida por *Acetobacter Xylinum* se muestra a continuación.

#### **Figura 17**

*Espectro IR de celulosa bacteriana producida por Acetobacter Xylinum.*



Los resultados obtenidos mediante la espectroscopia IR (Figura 17) indican que la celulosa bacteriana tiene características de conformación específicas. En particular, se observaron picos característicos en los espectros IR en las regiones de 3430  $\text{cm}^{-1}$ , 2965  $\text{cm}^{-1}$ , 1446  $\text{cm}^{-1}$  y 1056  $\text{cm}^{-1}$ . El pico en 3430  $\text{cm}^{-1}$  se relaciona con la vibración de estiramiento de los grupos hidroxilo en la celulosa (Russell, 1979), lo cual es indicativo de la presencia de monómeros de glucosa unidos mediante enlaces glucosídicos. El pico en 2965  $\text{cm}^{-1}$  se relaciona con la vibración de estiramiento C-H (Fujii, 2000) y el pico en 1433  $\text{cm}^{-1}$  se relaciona con la vibración de flexión C-H, lo cual sugiere la presencia de estructuras de enlaces simples, lo cual es común de la estructura de la celulosa. Por último, el pico en 1045  $\text{cm}^{-1}$  se relaciona con C-O-C y C-O-H del anillo de glucosa, lo cual sugiere la presencia de una estructura de anillos de glucosa y una presencia de enlaces

glucosídicos (Kačuráková, 2002). En general, estos resultados indican que la celulosa bacteriana tiene una estructura consistente rica en carbono y una alta densidad de enlaces C-H y -OH que forman una estructura lineal en la celulosa.

### Contenido De Humedad

Luego de obtener quitosano y celulosa bacteriana y su respectivo análisis de identificación de cada compuesto por IR, se determina el contenido de humedad. El peso de las muestras pesadas y secadas se muestra a continuación.

**Tabla 8**

*Contenido de humedad de muestras de quitosano y celulosa bacteriana.*

Polisacárido	Peso inicial	Peso luego de secado (70 °C)	Contenido de humedad (%)
Quitosano	1 gramo	0.9170	8.30
Celulosa bacteriana	1 gramo	0.9995	0.05
Celulosa bacteriana sin tratamiento	3 gramos	0.137	95.43 %

En la Tabla 8 muestra que el contenido de humedad de quitosano es el más relevante, los resultados de humedad sugieren que las características higroscópicas de las combinaciones de quitosano-celulosa bacteriana están estrechamente relacionadas con la cantidad de quitosano presente en la matriz de dicha combinación. No se toma en cuenta a la celulosa bacteriana sin tratamiento con su alto contenido de humedad, dado que esta contiene colonias de bacterias de género *Acetobacter xylinum* y otros componentes pertenecientes a su cultivo, lo cual implica impurezas en la matriz QCB.

### Obtención De Biopelícula De Quitosano-Celulosa Bacteriana

Las mezclas de quitosano, celulosa bacteriana y gelatina en presencia de glicerina (1.26 g) muestran poca solubilidad en agua destilada.

Las películas formadas (Tabla 4) en la estufa (70 °C) son extraídas de su molde y se realiza la determinación de su peso, el cual se encuentra en la siguiente tabla.

**Tabla 9**

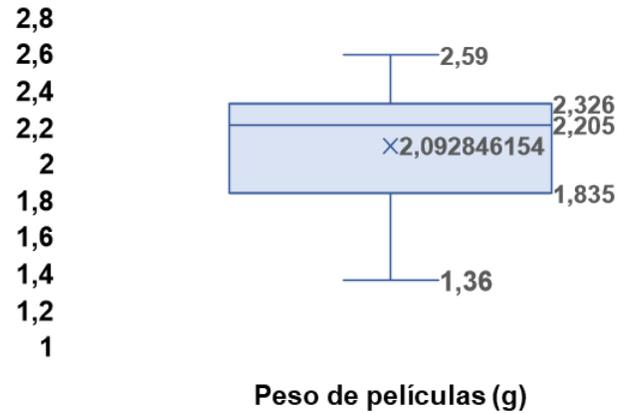
*Peso de película gelificada para cada combinación de quitosano, celulosa bacteriana y gelatina.*

N° Muestra	Masa de quitosano (gr)	Masa de celulosa (gr)	Masa de gelatina (gr)	Peso total inicial	Peso de película gelificada
1	0.5900	0.4101	0.1159	2.3759	1.5820
2	0.5900	0.4101	0.3245	2.5845	1.8210
3	0.5900	0.4101	0.5331	2.7931	2.3030
4	0.1799	0.8201	0.0989	2.3589	1.5750
5	0.3000	0.7000	0.2400	2.5000	2.0070
6	0.3000	0.7000	0.0900	2.3500	1.6130
7	0.0000	0.0000	1.0000	2.2600	1.0190
8	1.0000	0.0000	0.5500	2.8100	2.2050
9	1.0000	0.0000	0.8500	3.1100	2.2510
10	0.0000	0.0000	1.0000	2.2600	1.0150
11	0.1799	0.8201	0.5500	2.8100	2.1250
12	0.5900	0.4101	0.5331	2.7931	2.3150
13	0.5900	0.4101	0.3245	2.5845	1.8320

Estos resultados de peso de cada película formada son relevantes dado que contienen información de la combinación de contenido de humedad de la matriz QCB y también sobre la fracción gel luego de haberse formado la película. El rango de los pesos de cada película presenta un mínimo de 1.36 y un máximo de 2.59, como se puede apreciar en el diagrama de caja que se muestra a continuación.

**Figura 18**

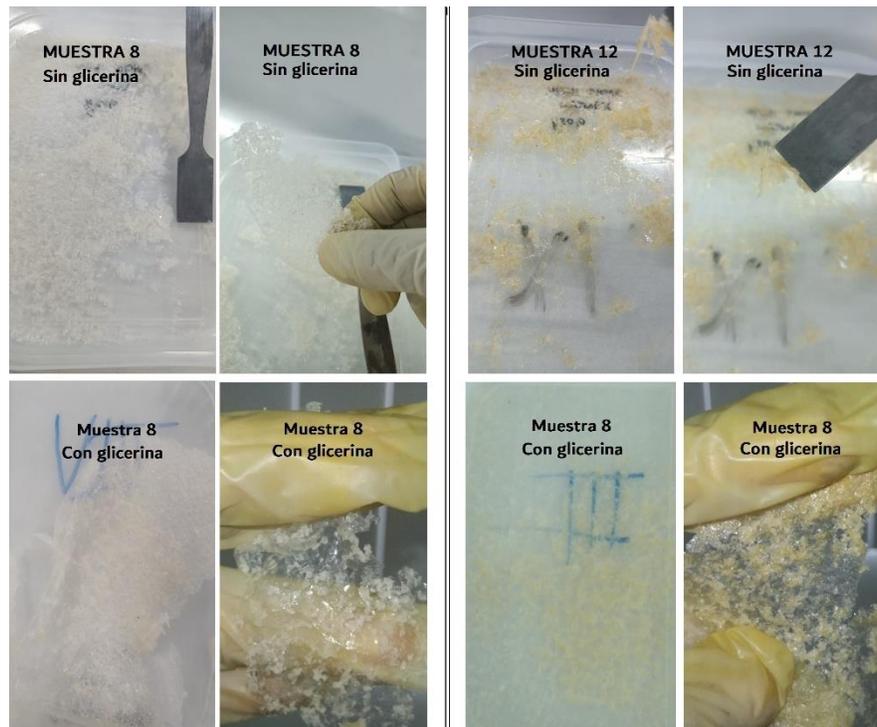
Diagrama de caja de la distribución de pesos cada película formada de QC y gelatina.



La glicerina era necesaria para mejorar las propiedades estructurales como la formación de la película, dado que mejora la resistencia de la matriz de QCB y gelatina, esto se puede observar a continuación, donde se realiza el proceso de las muestras 8 y 12 sin glicerina y con glicerina.

**Figura 19**

Muestra 8 y 12 sin glicerina y con glicerina.



Como se puede observar en la Figura 19 la muestra 8 sin glicerina presenta una película quebradiza con poca resistencia y cuando tiene glicerina forma una película con más resistencia, por otra parte, la muestra 12 sin glicerina no forma película y cuando presenta glicerina su estructura es más rígida formando película.

### **Análisis del Diseño Central Compuesto**

#### ***Fracción Gel***

La fracción gel para cada matriz de QCB y gelatina se encuentra en función de del peso de cada película reticulada (Tabla 9). Empleando la ecuación (2) con los datos de  $W_1$  (peso de película gelificada) y  $W_0$  (Peso total inicial) se procede a realizar la determinación de fracción gel.

**Tabla 10**

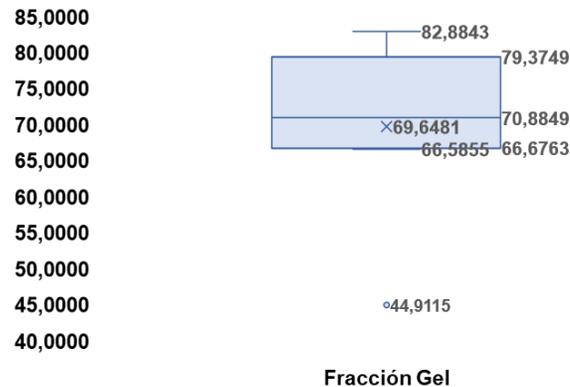
*Determinación de fracción gel para cada matriz de QCB y gelatina.*

N° Muestra	Peso total inicial	Peso de película gelificada	Fracción Gel
1	2.3759	1.5820	66.5855
2	2.5845	1.8210	70.4593
3	2.7931	2.3030	82.4546
4	2.3589	1.5750	66.7672
5	2.5000	2.0070	80.2800
6	2.3500	1.6130	68.6383
7	2.2600	1.0190	45.0885
8	2.8100	2.2050	78.4698
9	3.1100	2.2510	72.3794
10	2.2600	1.0150	44.9115
11	2.8100	2.1250	75.6228
12	2.7931	2.3150	82.8843
13	2.5845	1.8320	70.8849

Los resultados de fracción gel (Tabla 10) indican que existe un rango de fracción gel de 66.5855 – 82.8843 %, con una media de 70.8849 %, esta interpretación se puede apreciar en el diagrama de caja que se muestra a continuación.

**Figura 20**

*Diagrama de caja para la distribución de pesos de muestras de películas de QCB y gelatina.*

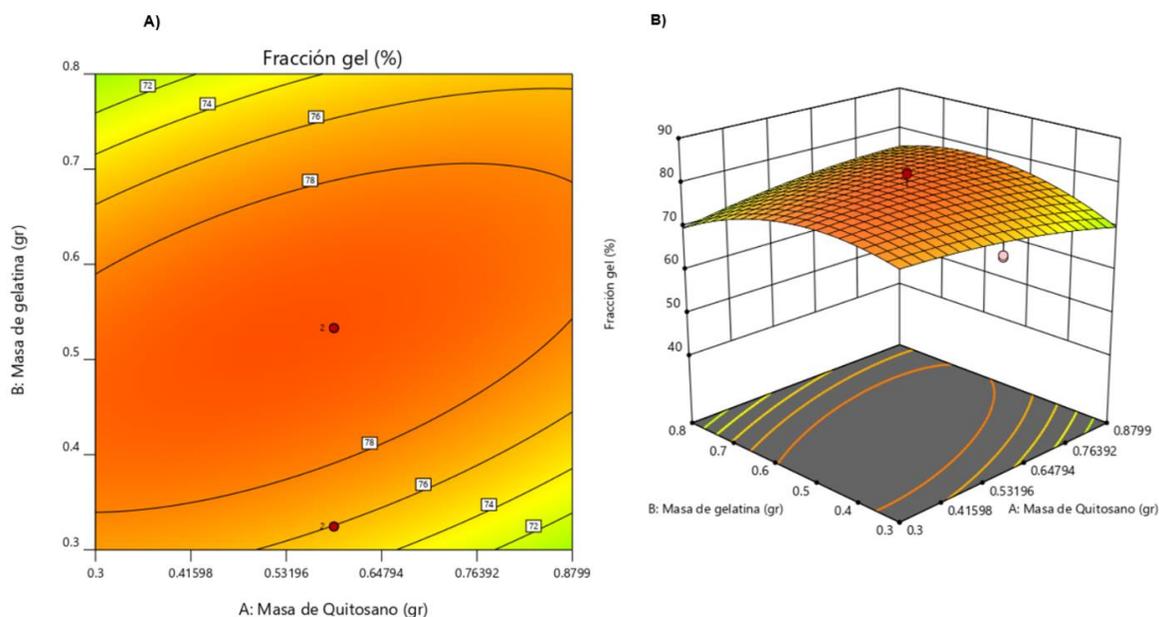


En la Figura 20 el valor de 44.9115% de fracción gel perteneciente de la gelatina pura (valor atípico), indica que la aportación de la gelatina para mejorar la fracción gel es mínima, por siguiente se puede sugerir que la composición de QCB es la determinante para aumentar la fracción gel.

Para tener una mejor interpretación de los valores de fracción gel, se realiza un DCC mediante el uso de un paquete de software estadístico. A continuación, se muestran los resultados del RSM de las películas de QCB y gelatina.

### Figura 21

Gráfico de superficie de respuesta de fracción gel de películas de QC y gelatina.



En la Figura 21B se observa que a medida que los valores de concentración QCB se acercan en su media (50% de cada componente en la mezcla de QCB) junto con el contenido de gelatina, cuando es el 50% aproximadamente de mezcla total (QCB y gelatina) se obtiene buenos valores de fracción gel, los cuales rondan valores mayores a 78% (Figura 21A). No obstante, se espera tener una mayor fracción después de aplicar la gelificación con ajuste de pH, dado que la mezcla era poco soluble.

**Ajuste De pH De Película De QCB y Gelatina.** Se realizó el ajuste de pH a las películas del análisis anterior dado que se desea aumentar la fracción gel de película de QCB. Los resultados de fracción gel luego de añadir  $\text{CH}_3\text{COOH}$  y luego neutralizando con  $\text{NaOH}$  se muestran a continuación.

**Tabla 11**

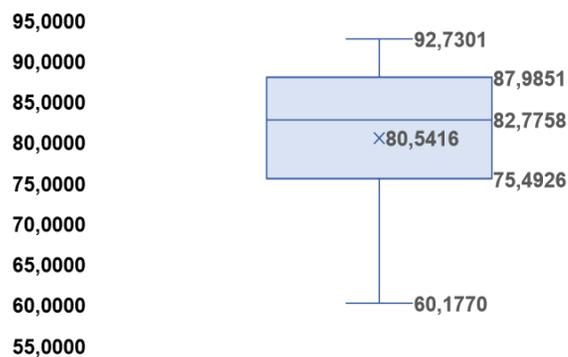
*Fracción gel después del ajuste de pH de películas de QCB y gelatina.*

N° Muestra	Peso total inicial	Peso de película gelificada	Fracción Gel
1	2.3759	1.8080	76.0977
2	2.5845	2.2180	85.8202
3	2.7931	2.5870	92.6227
4	2.3589	1.8350	77.7890
5	2.5000	2.1950	87.8000
6	2.3500	2.0720	88.1702
7	2.2600	1.3650	60.3982
8	2.8100	2.3260	82.7758
9	3.1100	2.3290	74.8875
10	2.2600	1.3600	60.1770
11	2.8100	2.3170	82.4555
12	2.7931	2.5900	92.7301
13	2.5845	2.2050	85.3172

En la Tabla 11 se muestra valores de fracción gel después del ajuste de pH, se identifica un rango de 60.1770 – 97.7301 %, con una media de 82.7758 %, se muestra la gráfica de caja para poder visualizar esta interpretación de los valores.

**Figura 22**

*Diagrama de caja de la fracción gel de cada matriz QCB y gelatina después del ajuste de pH.*

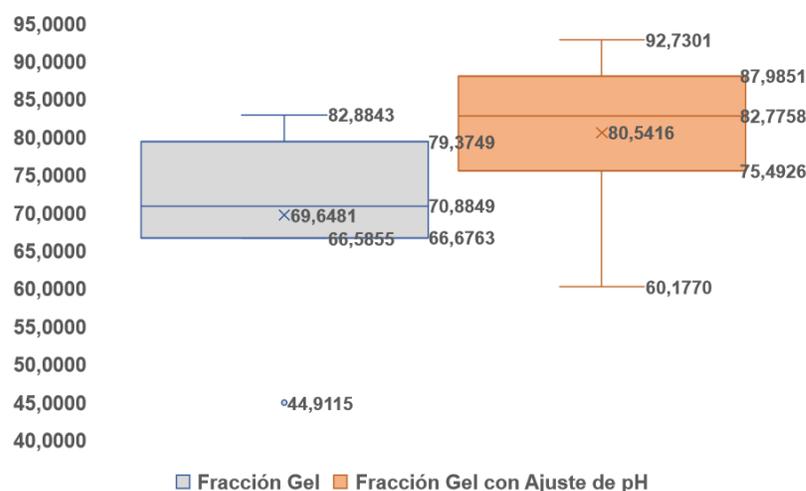


Fracción gel con ajuste de pH

Observando la Figura 20 y Figura 22 se puede apreciar una mejora en los resultados de fracción gel de la matriz de QCB y gelatina, lo que indica después de realizar el ajuste de pH se mejoran significativamente la fracción gel de las películas de QCB. El aumento de fracción gel de las películas de QCB y gelatina se pueden apreciar en el siguiente diagrama de caja.

### Figura 23

Diagrama de caja de fracción gel antes y después de ajuste de pH.

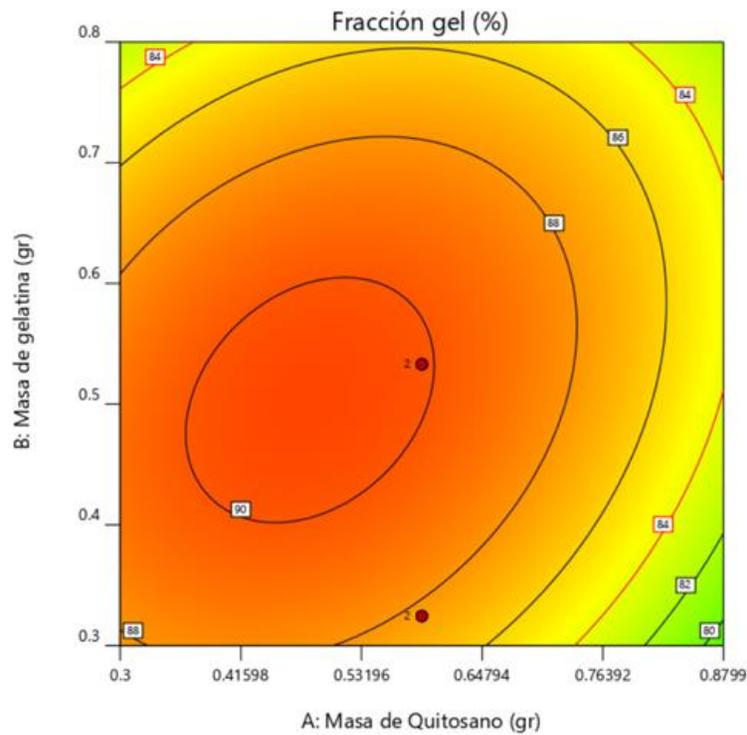
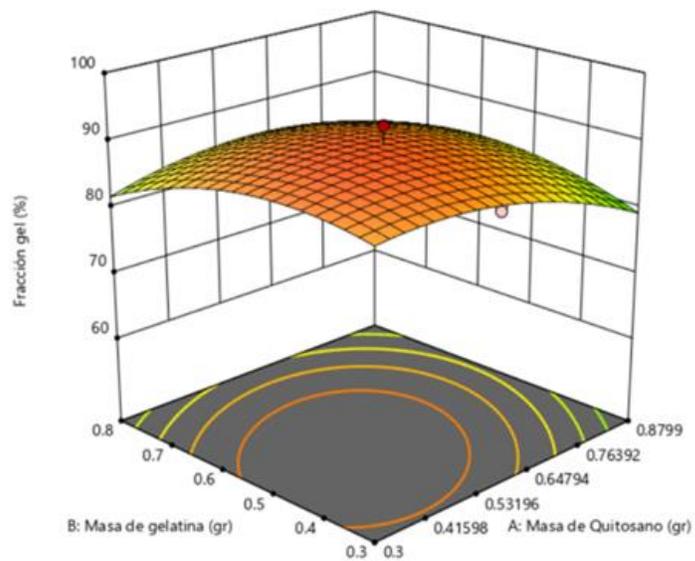


En el diagrama de caja (Figura 23) se puede apreciar un desplazamiento positivo en los valores de fracción gel, luego de realizar un ajuste de pH, se puede apreciar un aumento de la media de 70.8849 % a un 82.7758 % en la fracción gel (aumento del 10.9778%). Esto se debe a la buena solubilidad que tiene tanto el quitosano y celulosa bacteriana cuando se encuentran en soluciones ácidas en comparación de cuando se encuentran diluidas en agua destilada.

Para poder analizar los efectos de la composición de la matriz QCB y gelatina después de aplicar un ajuste de pH se realiza un análisis RSM. Los resultados de este análisis se muestran a continuación.

**Figura 24**

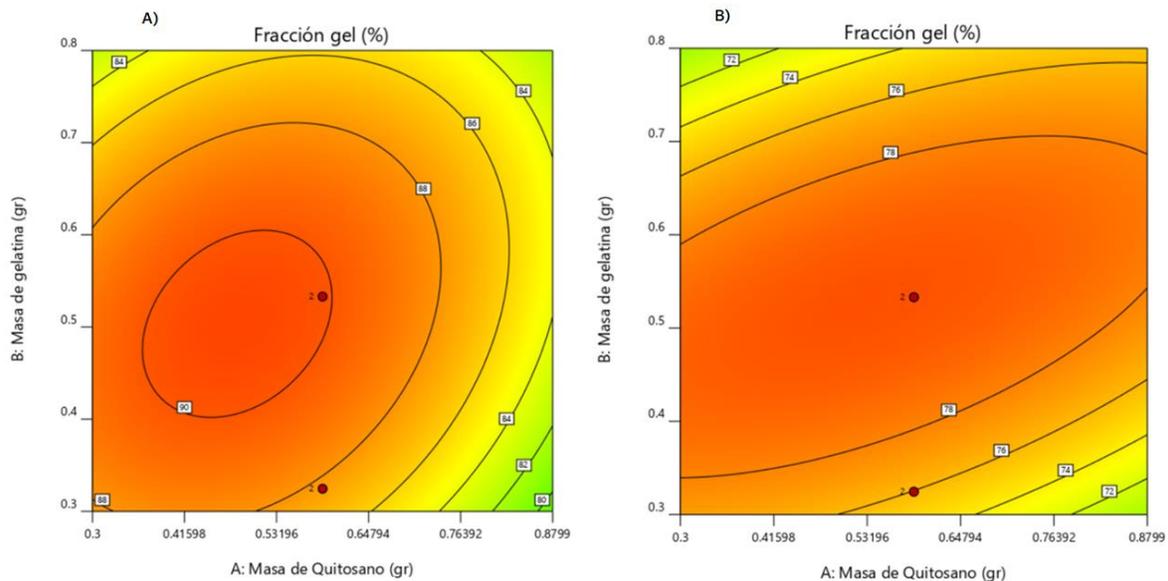
Gráfico de superficie de respuesta después de ajuste de pH en las películas de QCB y gelatina.

**B)**

En la Figura 24 se puede observar un punto medio donde la fracción gel se maximiza, en donde dentro del contorno central se encuentran valores mayores a 90% cuando la combinación de QCB se encuentra en un rango aproximado de 36% a 60% de quitosano (64% a 40% celulosa bacteriana) y se tiene un rango aproximado de 40% a 60% de gelatina en la mezcla total, a este rango en este estudio se le asigna el nombre del rango de la mejor fracción gel (RMFG). Se muestra la comparación de RSM de fracción gel de cada película antes y después del ajuste de pH.

**Figura 25**

*Comparación de respuesta de superficie de A) fracción después y B) antes de ajuste de pH.*



Un diagrama de contorno con formas curvilíneas (Figura 25B) indica que existe una relación no lineal entre las variables independientes (composición de QCB y gelatina) y la respuesta (fracción gel). Estas formas curvilíneas suelen indicar que hay una interacción compleja entre las variables independientes.

La observación del cambio en la forma del diagrama de contorno (Figura 25A) luego del tratamiento ácido puede indicar que el tratamiento ácido ha alterado la relación entre las variables independientes y la respuesta, haciéndola más lineal y predecible.

Además, se observa una mejora en la respuesta de fracción gel después del tratamiento ácido, lo que puede indicar que el tratamiento ácido ha aumentado la eficacia de la combinación QCB y gelatina para formar geles.

### **Viscosidad**

Luego de obtener buenos resultados de fracción gel de las películas QCB y gelatina, se evalúa la viscosidad de cada muestra, empleando el viscosímetro rotacional. Los resultados de la medición de la viscosidad se muestran a continuación.

**Tabla 12**

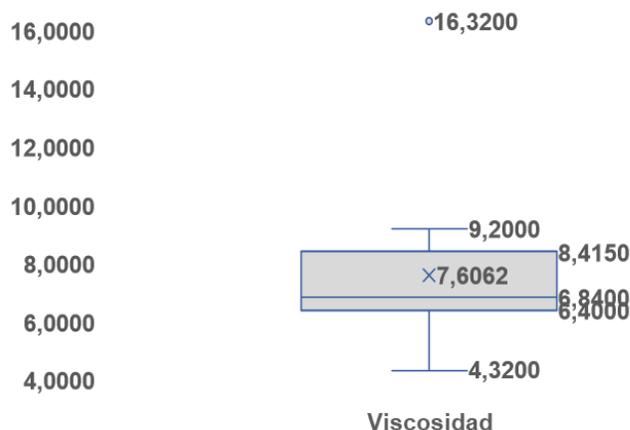
*Resultados de viscosidad para cada película de QCB y gelatina.*

Nº Muestra	1	2	3	4	5	6	7
Viscosidad (cP)	6,35	6,46	9,15	4,32	7,68	5,29	6,82
Nº Muestra	8	9	10	11	12	13	
Viscosidad (cP)	6,84	16,32	6,88	7,12	9,2	6,45	

La Tabla 12 muestra que la viscosidad de las muestras tiene un mínimo de 4.32, un máximo de 16.3200 y una media de 7.6062 de cP (centipoise), estas interpretaciones se pueden observar a continuación en un diagrama de caja.

**Figura 26**

Diagrama de caja de viscosidades de hidrogeles de QCB y gelatina.



Los valores bajos de cP se debe a la neutralización en el ajuste ácido, dado que, en un estudio realizado para comprender mejor el efecto de la sal en los mecanismos de gelificación (Liu, 2008), se argumenta que el contenido de sal produce cambios en las entropías de solvatación de los iones, en otras palabras, provoca cambios de viscosidad. Otro estudio del efecto de las sales en los hidrogeles polielectrolíticos (Tong, 2022) sugiere que el contenido de sal puede romper los enlaces de hidrógeno presente en los hidrogeles, de esa forma disminuyendo la viscosidad y aumentando el tiempo de formación del hidrogel.

Para demostrar la disminución de la viscosidad se eligió al azar una combinación para volver a crear el hidrogel de QCB con gelatina, esta vez sin añadir NaOH. La combinación seleccionada fue el de la muestra N°5 (Tabla 4). El resultado de viscosidad sin neutralización se muestra a continuación.

**Figura 27**

Viscosidad de muestra N°5 sin neutralizar.



Como se puede ver en la Figura 27, se tiene una viscosidad de 42.66 cP en la viscosidad de la muestra sin neutralizar, dando entender que el proceso de neutralización disminuyo considerablemente su viscosidad, dado que la formación de sales al agregar NaOH hace que su valor disminuya a 7.68 cP, siendo este el 18% de su valor.

También se realizó otra prueba tomando una combinación al azar para ver si al poner en la estufa a 70 °C durante 18 horas (necesario para estimar la fracción gel) también podría afectar la viscosidad del hidrogel. Se seleccionó la muestra N°8, la cual se volvió hacer de dos formas, una sin neutralizar ni secar y otra sin neutralizar con secado a la estufa a 70 °C durante 18 horas, los resultados de esta prueba se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 13**

*Viscosidad de la muestra N°8 sin neutralizar, alternando el calentamiento en estufa.*

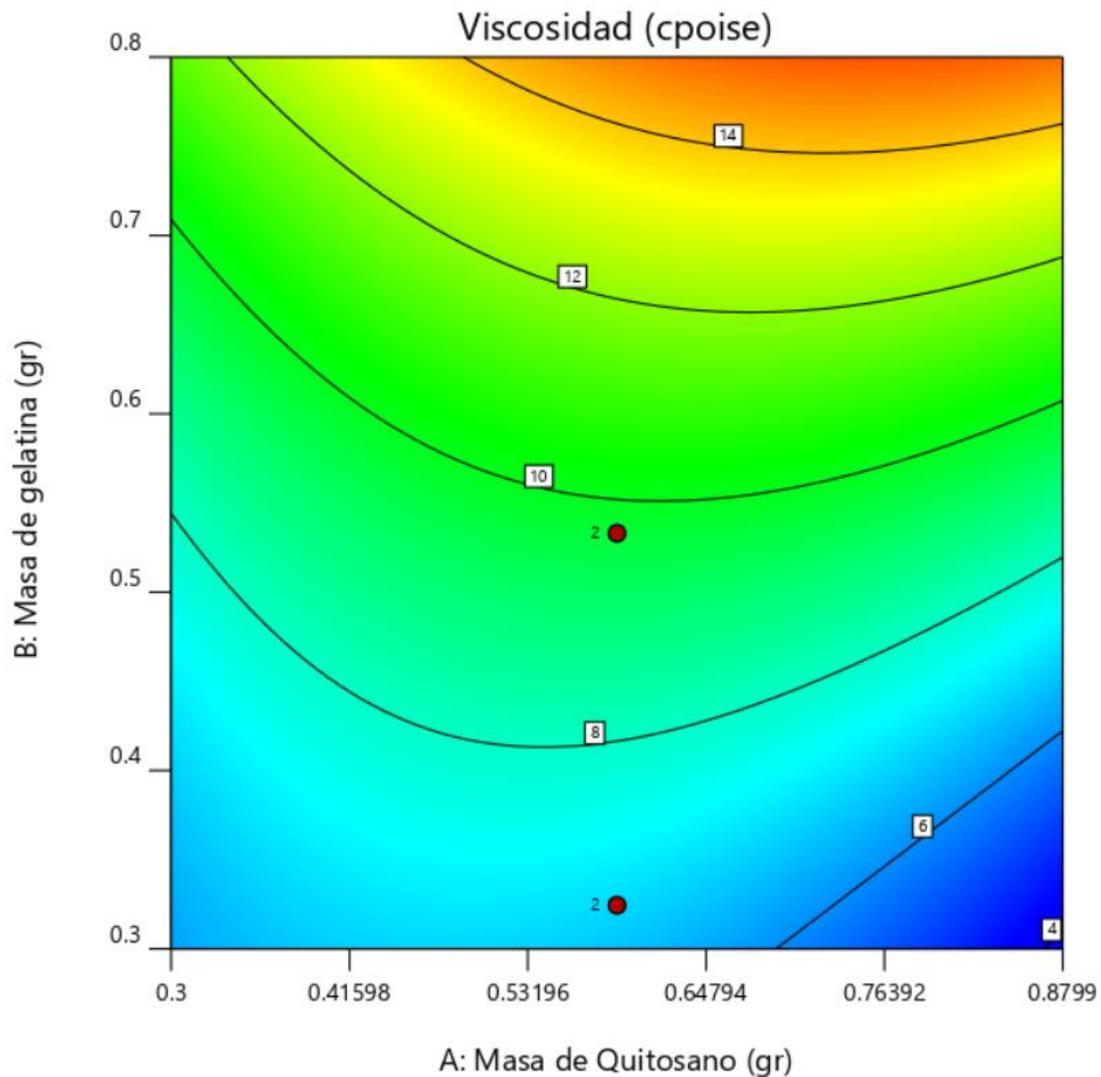
Repetibilidad = 3		Repetibilidad = 3		Disminución de la viscosidad	
Muestra N°8 Sin neutralizar y sin secar		Muestra N°8 Sin neutralizar y con secado			
287.4500 cP		93.37 cP		67.5178%	
285.2500 cP		91.06 cP		68.0771%	
286.3600 cP		92.74 cP		67.6142%	
Promedio	286.3533 cP	Promedio	92.39 cP	Promedio	67.7364%

Los resultados de variación de viscosidad (Tabla 13) tienen en cuenta los efectos de la neutralización y el secado. Se puede ver que después de neutralizar, la viscosidad disminuyó en un 82% y durante el proceso de secado para obtener la fracción gel, la viscosidad disminuyó en un 67.7364%. En total, las muestras estudiadas experimentaron una disminución de la viscosidad del 94.1925%.

Dado que a todas las muestras se le agregó la misma cantidad de ácido y base, se realiza un estudio cualitativo para determinar la composición óptima para obtener un hidrogel a base de película de QCB y gelatina con mayor viscosidad. Para esto se realiza un RSM a las muestras de hidrogeles. Los resultados del RSM se muestra a continuación.

**Figura 28**

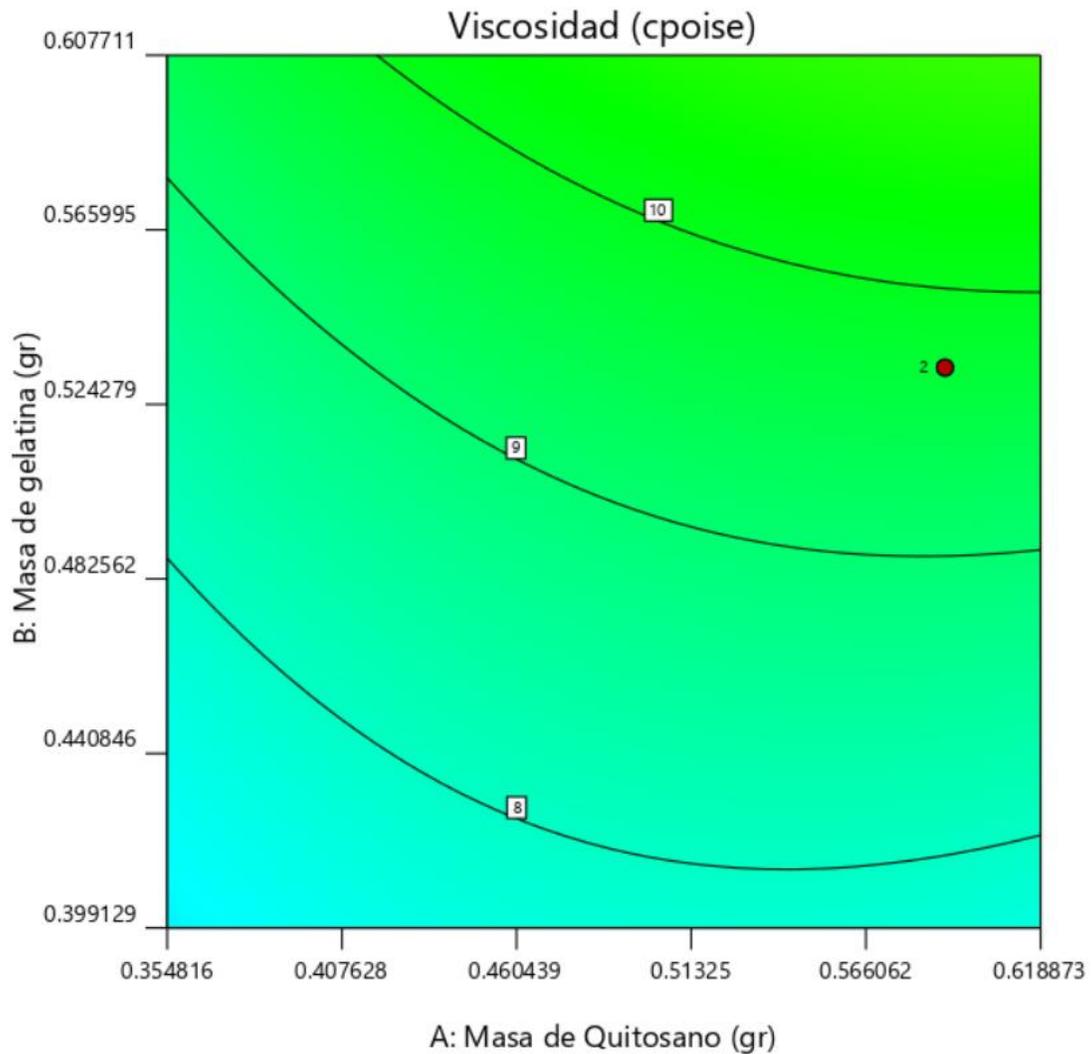
Gráfico de RSM de viscosidad de cada hidrogel de QCB y gelatina.



El gráfico de contorno del RSM (Figura 28) indica que a medida que se aumenta el contenido de gelatina, aumenta la viscosidad de los hidrogeles a base de QCB, no obstante, los componentes principales del hidrogel son el quitosano y la celulosa bacteriana, por ende, se analiza el rango según el RMFG.

**Figura 29**

Gráfico de superficie de respuesta, de viscosidad para un RMFG.



En la Figura 29 se puede apreciar que para un RMFG se obtiene valores de viscosidad mayores a la media (Figura 26), entre un 8 y 10 cP. De las muestras analizadas, la que se encuentra dentro del rango es el hidrogel que contiene 58.995% de quitosano en la mezcla de QCB y un 53.3050% de gelatina de la mezcla total, entonces la composición de la película de QCB-gelatina con mayor fracción gel y mejor viscosidad (muestra N°12), la cual presenta un 0.3848% para quitosano, 0.2675% de celulosa y

0.3477% de gelatina (porcentaje peso) de la cual se consideró como la mejor composición en comparación a las demás.

### Análisis Termogravimétrico

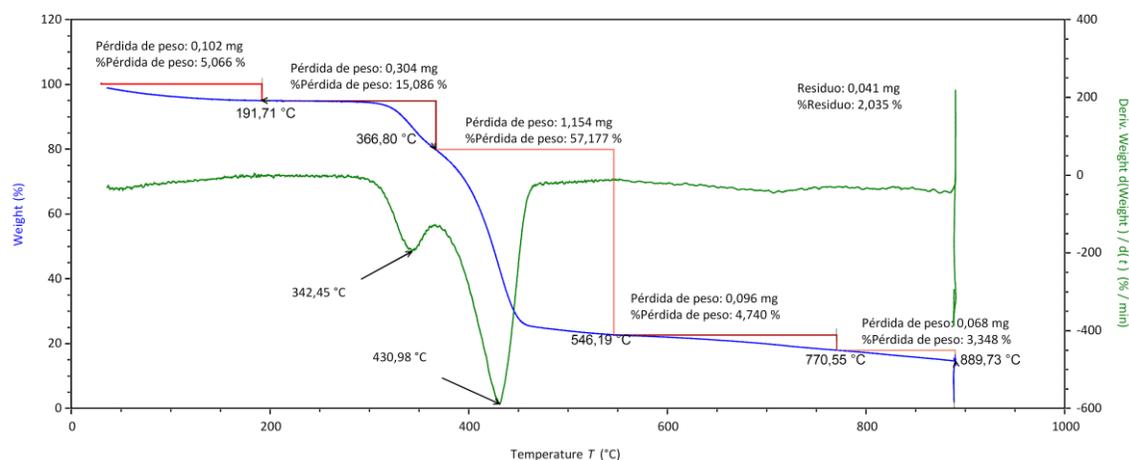
Se realiza un TGA para muestras de quitosano, celulosa bacteriana y de la película de QCB con gelatina (mejor composición de película en fracción gel y viscosidad).

### Análisis Termogravimétrico De Quitosano

Del análisis termogravimétrico del quitosano puro (2.031 mg), se obtuvo el siguiente resultado.

#### Figura 30

Análisis termogravimétrico de muestra de quitosano.



El TGA de la muestra de quitosano (Figura 30) demuestra una pérdida de masa en cinco etapas. La primera etapa se produce entre 50 y 191.71 °C, con una pérdida de masa del 5.066%, lo que probablemente se deba a la eliminación de agua. La segunda etapa comienza a 191.71 °C y continúa hasta 366.80 °C, donde se sugiere una posible descomposición del quitosano y se caracteriza por una pérdida de masa lenta de 15.086%. La tercera etapa es la degradación térmica del quitosano, que se produce desde 366.8 °C hasta 546.16 °C y resulta en una pérdida de masa considerable del 57.1770%. Las últimas etapas son de carácter lento y representan una pérdida de masa

del 4.7400% y del 3.3480%. El DTG del quitosano indica la existencia de dos puntos de mayor pérdida de masa: el primero a una temperatura de 342.45 °C con una pérdida de masa del 15.0860%, y el segundo, con una mayor pérdida de masa, se produce a 430.98 °C.

El quitosano presento un contenido de ceniza (residuo que se quedó a 888.73 °C) de 2.035% con una masa de 0.041 mg, si se excluye el agua (perdida de 5.066% de masa) el contenido de ceniza es de:

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{0.041 \text{ mg}}{(2.031 \text{ mg} - 2.031 \text{ mg} * 0.05066)} \times 100\% \quad (13)$$

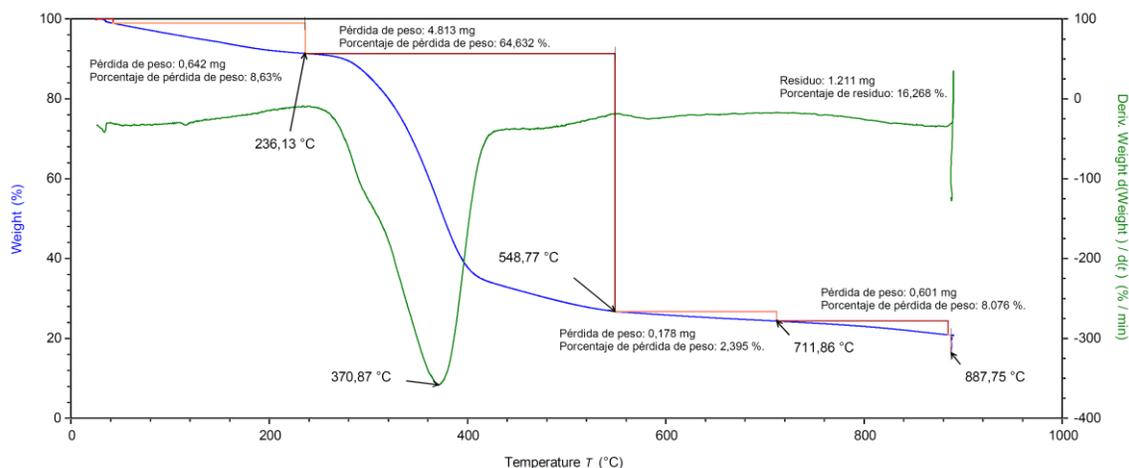
$$\% \text{ Ceniza} = 2.1264\%$$

### **Análisis Termogravimétrico De Celulosa Bacteriana**

Del TGA de la celulosa bacteriana (7.467 mg), se muestra el siguiente resultado.

**Figura 31**

*Análisis termogravimétrico de muestra de celulosa bacteriana.*



El TGA de la celulosa bacteriana (Figura 31) presentó cuatro etapas. En la primera etapa, la muestra de celulosa bacteriana mostró una pequeña pérdida de peso desde la temperatura de 50 °C hasta los 236.13 °C de 8.63%, que se atribuye a la evaporación del

agua presente acompañado de un proceso de descomposición. Posteriormente, a temperaturas entre 236.13 °C y 548.77 °C ocurre la degradación térmica de la muestra de celulosa bacteriana, lo que produjo una fuerte disminución de peso, que alcanzó un 64.632%. Este proceso de degradación de la celulosa se atribuye a la despolimerización, la deshidratación y la descomposición de las unidades de glucosa, y culmina con la formación de un residuo de carbono (Golova, 1975), donde en las últimas etapas se observó pérdidas de masa muy lentas de 2.395% y 8.067%. El DTG de la celulosa bacteriana indica que la temperatura donde ocurre la mayor degradación térmica se da en 370.87 °C.

La celulosa bacteriana presento un contenido de ceniza de 16.268% con una masa de 1.211 mg. Sin tomar en cuenta al contenido de agua (pérdida de 8.63% de masa), el contenido de ceniza es de:

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{1.211 \text{ mg}}{(7.467 \text{ mg} - 7.467 \text{ mg} * 0.0863)} \times 100\% \quad (14)$$

$$\% \text{ Ceniza} = 17.7499\%$$

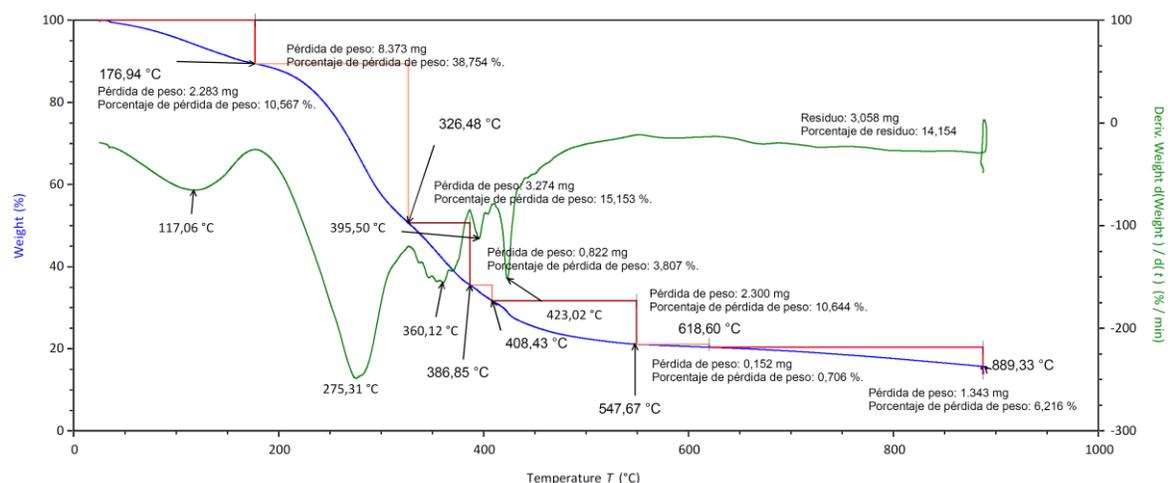
El contenido de ceniza en la celulosa es alto, no obstante, en un estudio realizado por Pacheco, G (2017) que realiza un TGA de varias muestras de celulosa bacteriana según su fuente de carbono durante su cultivo, se obtuvo un rango de contenido de residuo (contenido de ceniza) de 5% al 15%.

### ***Análisis Termogravimétrico De Biopelícula De Quitosano Y Celulosa Bacteriana***

Del TGA de la mejor película (N° de QCB con gel (21.6480 mg), se obtuvo el siguiente resultado.

**Figura 32**

*Análisis termogravimétrico de película quitosano-celulosa bacteriana con gelatina (óptima).*



Del TGA de la película QCB con gelatina (Figura 32), se identificaron siete etapas de cambio en la masa. En la primera etapa, se produjo una pérdida de masa del 10.567% debido a la evaporación del agua, con un rango de temperatura desde 50 °C hasta 176.94 °C. En la segunda etapa, que se ubicó entre 176.94 °C y 326.48 °C, se observó una fuerte pérdida de masa del 38.754% debido a la degradación térmica de QCB y gelatina. La tercera, cuarta y quinta etapa, ubicadas en un rango de temperatura desde 326.48 °C hasta 547.67 °C, continuaron con la degradación térmica y produjeron pérdidas de masa del 15.153%, 3.807% y 10.644%, respectivamente. En las últimas etapas, las pérdidas de masa se ralentizaron, con una disminución del 0.706% entre 547.67 °C y 618.60 °C, y una disminución del 6.216% entre 618.60 °C y 889.33 °C. El DTG muestra el punto con mayor pérdida de masa durante la degradación térmica, la cual ocurre a 275.31 °C.

El contenido de ceniza de la película de QCB con gelatina, es de 14.154 % (3.058 mg), excluyendo al agua (pérdida de masa de 10.567%), el contenido de ceniza es de:

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{3.058 \text{ mg}}{(21.648 \text{ mg} - 21.648 \text{ mg} * 0.1567)} \times 100\% \quad (15)$$

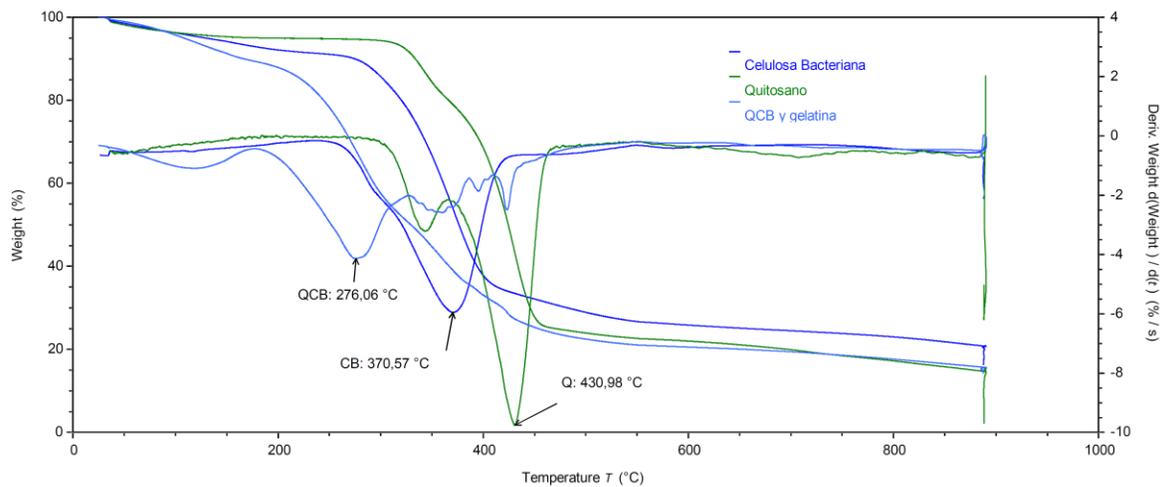
$$\% \text{ Ceniza} = 16.7509\%$$

El valor de contenido de ceniza de 16.7509 % es alto por el contenido de celulosa bacteriana y gelatina.

A continuación, se realiza una comparación de los análisis termogravimétricos del quitosano, celulosa bacteriana y la película de QCB con gelatina.

### Figura 33

*Comparación de análisis termogravimétrico de quitosano, celulosa bacteriana y película de QCB.*



En la Figura 33 se puede observar que en el DTG los valores críticos de temperatura en la pérdida de masa son menores en la película de QCB con gelatina, esto indica que su temperatura de degradación térmica es menor en comparación a la del quitosano o celulosa bacteriana.

## Capítulo V

### Conclusiones y Recomendaciones

#### Conclusiones

- Se logró producir quitosano a partir de exoesqueletos de camarón con un rendimiento del 36.3278% a través de las condiciones experimentales empleadas. La desacetilación alcalina de la quitina resultó en quitosano de un alto grado de desacetilación, con un 85.46% de desacetilación.
- A través del cultivo de *Acetobacter Xylinum*, se produjo celulosa bacteriana rica en carbono, con una tasa de producción de 0.17 gramos al día en condiciones normales. Durante el proceso de purificación y secado, se observó una disminución significativa en el contenido de humedad y peso de la celulosa bacteriana.
- En la producción de hidrogel a base de película de quitosano-celulosa bacteriana, se demostró que ajustar el pH resultó en un aumento en la fracción gel, con un incremento del 10.9778% del valor medio. Además, se demostró una disminución significativa de viscosidad del 94.1925% cuando el proceso incluía calentar la muestra a temperatura igual o superior a 70 °C y se encontraba en presencia de sales.
- Se estableció un rango óptimo de composición para la producción de películas de quitosano-celulosa bacteriana con valores altos de fracción gel y viscosidad, a través de un riguroso estudio de superficie de respuesta. Dentro de este rango óptimo se logró demostrar una degradación térmica en menores temperaturas en comparación al quitosano y celulosa bacteriana puros.
- Las películas de quitosano-celulosa bacteriana son prometedoras para su uso en la regeneración de heridas y quemaduras debido a sus propiedades

antiinflamatorias, analgésicas y cicatrizantes, identificadas en otros estudios previos. Además, la presencia de una alta fracción gel y viscosidad en estas películas permite su adherencia a la piel, manteniéndola hidratada y protegiéndola contra bacterias, lo que refuerza su potencial aplicación médica.

### **Recomendaciones**

- Se recomienda que, en los procesos de lavado continuo, asegurarse que el pH quede totalmente neutralizado, dado que la presencia de sales podría existir un efecto en las propiedades fisicoquímicas.
- Para una mayor producción de celulosa bacteriana es importante tener en cuenta la temperatura y fuente de carbono. La temperatura y la fuente de carbono son factores críticos en la producción de celulosa bacteriana. La temperatura afecta el crecimiento bacteriano, mientras que la fuente de carbono es la materia prima utilizada para la producción de celulosa. Por lo tanto, es fundamental considerar ambos factores para lograr una producción eficiente y de alta calidad de celulosa bacteriana.
- Para lograr una producción de hidrogel de quitosano y celulosa bacteriana con altos valores de viscosidad, se recomienda la neutralización mediante lavado continuo y se recomienda omitir el proceso de secado con calor ya que este proceso solo era necesario para determinar la fracción gel y se sugiere realizar secado al vacío.
- Se recomienda realizar ensayos de actividad antibacteriana para determinar la viabilidad de la película de quitosano y celulosa bacteriana en la ingeniería de regeneración de tejidos. La realización de estas pruebas puede proporcionar información valiosa sobre el potencial de la película de quitosano y celulosa bacteriana para ser utilizada en aplicaciones médicas.

## Bibliografía

Abd Manan, T. S. B., Beddu, S., Mohamad, D., Kamal, N. L. M., Itam, Z., Khan, T., ... & Rasdi, N. W. (2021). Physicochemical properties of absorbent hydrogel polymers in disposable baby diapers. *Chemical Physics Letters*, 774, 138605.

Aenugu, H. P. R., Kumar, D. S., Srisudharson, N. P., Ghosh, S. S., & Banji, D. (2011). Near infra red spectroscopy—An overview. *International Journal of ChemTech Research*, 3(2), 825-836.

Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry. *LWT-food science and technology*, 43(6), 837-842.

Akhgar, C. K., Ramer, G., Żbik, M., Trajnerowicz, A., Pawluczyk, J., Schwaighofer, A., & Lendl, B. (2020). The next generation of IR spectroscopy: EC-QCL-based mid-IR transmission spectroscopy of proteins with balanced detection. *Analytical chemistry*, 92(14), 9901-9907.

Alonso, I. S., Ruiz, S. G., Quintanilla, D. P., & Zarcero, S. M. (2009). *Analisis instrumental (Vol. 1)*. Netbiblo.

Alven, S., & Aderibigbe, B. A. (2020). Chitosan and cellulose-based hydrogels for wound management. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9656.

Amarasekara, A. S., Wang, D., & Grady, T. L. (2020). A comparison of kombucha SCOBY bacterial cellulose purification methods. *SN Applied Sciences*, 2(2), 1-7.

Balázs, N., & Sipos, P. (2007). Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Carbohydrate research*, 342(1), 124-130.

Barbosa, J. R., & de Carvalho Junior, R. N. (2021). Polysaccharides obtained from natural edible sources and their role in modulating the immune system: Biologically active potential that can be exploited against COVID-19. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 223-235.

Barsett, H., Ebringerová, A., Harding, S. E., Heinze, T., Hromádková, Z., Muzzarelli, C., ... & El Seoud, O. A. (2005). Polysaccharides I: structure, characterization and use.

Berthod, F., Sahuc, F., Hayek, D., Damour, O., & Collombel, C. (1996). Deposition of collagen fibril bundles by long-term culture of fibroblasts in a collagen sponge. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, 32(1), 87-94.

Camargo, M. S. A., Cercal, A. P., Silveira, V. F., Mancinelli, K. C. B., Gern, R. M. M., Garcia, M. C. F., ... & Pezzin, A. P. T. (2020, December). Evaluation of wet bacterial cellulose degradation in different environmental conditions. In *Macromolecular Symposia* (Vol. 394, No. 1, p. 2000149).

Carvalho, T., Guedes, G., Sousa, F. L., Freire, C. S., & Santos, H. A. (2019). Latest advances on bacterial cellulose-based materials for wound healing, delivery systems, and tissue engineering. *Biotechnology journal*, 14(12), 1900059.

Chang, S. K., & Zhang, Y. (2017). Protein analysis. In *Food analysis* (pp. 315-331). Springer, Cham.

Chen, L., & Huang, G. (2018). The antiviral activity of polysaccharides and their derivatives. *International journal of biological macromolecules*, 115, 77-82.

Correia, R. M., Domingos, E., Tosato, F., dos Santos, N. A., Leite, J. D. A., da Silva, M., ... & Romao, W. (2018). Portable near infrared spectroscopy applied to abuse drugs and medicine analyses. *Analytical Methods*, 10(6), 593-603.

Crupi, V., Majolino, D., Mondello, M. R., Migliardo, P., & Venuti, V. (2002). FT-IR spectroscopy: a powerful tool in pharmacology. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 29(6), 1149-1152.

Czechowska-Biskup, R., Jarosińska, D., Rokita, B., Ulański, P., & Rosiak, J. M. (2012). Determination of degree of deacetylation of chitosan-comparision of methods. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, (17), 5-20.

Dave, D., Liu, Y., Pohling, J., Trenholm, S., & Murphy, W. (2020). Astaxanthin recovery from Atlantic shrimp (*Pandalus borealis*) processing materials. *Bioresource Technology Reports*, 11, 100535.

De Masi, A., Tonazzini, I., Masciullo, C., Mezzena, R., Chiellini, F., Puppi, D., & Cecchini, M. (2019). Chitosan films for regenerative medicine: Fabrication methods and mechanical characterization of nanostructured chitosan films. *Biophysical Reviews*, 11(5), 807-815.

Dimzon, I. K. D., & Knepper, T. P. (2015). Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares. *International journal of biological macromolecules*, 72, 939-945.

Doktorovova, S., & Souto, E. B. (2009). Nanostructured lipid carrier-based hydrogel formulations for drug delivery: a comprehensive review. *Expert opinion on drug delivery*, 6(2), 165-176.

Dong, Y., Xu, C., Wang, J., Wang, M., Wu, Y., & Ruan, Y. (2001). Determination of degree of substitution for N-acylated chitosan using IR spectra. *Science in China Series B: Chemistry*, 44, 216-224.

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

Du, X., Li, J., Chen, J., & Li, B. (2012). Effect of degree of deacetylation on physicochemical and gelation properties of konjac glucomannan. *Food Research International*, 46(1), 270-278.

Fernández-Carrasco, L., Torrens-Martín, D., Morales, L. M., & Martínez-Ramírez, S. (2012). Infrared spectroscopy in the analysis of building and construction materials. *Infrared spectroscopy—Materials science, engineering and technology*, 510.

Fiore, T., & Pellerito, C. (2021). Infrared Absorption Spectroscopy. *Spectroscopy for Materials Characterization*, 129-167.

Fujii, A., Fujimaki, E., Ebata, T., & Mikami, N. (2000). Infrared spectroscopy of CH stretching vibrations of jet-cooled alkylbenzene cations by using the "messenger" technique. *The Journal of Chemical Physics*, 112(14), 6275-6284.

Garrido, T., Etxabide, A., de la Caba, K., & Guerrero, P. (2017). Versatile soy protein films and hydrogels by the incorporation of  $\beta$ -chitin from squid pens (*Loligo* sp.). *Green Chemistry*, 19(24), 5923-5931.

Gerrard, J. A. (2002). Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends in food science & technology*, 13(12), 391-399.

Gingras, M., Paradis, I., & Berthod, F. (2003). Nerve regeneration in a collagen–chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice. *Biomaterials*, 24(9), 1653-1661.

Golova, O. G. P. (1975). Chemical effects of heat on cellulose. *Russian Chemical Reviews*, 44(8), 687.

Gorgieva, S., & Trček, J. (2019). Bacterial cellulose: Production, modification and perspectives in biomedical applications. *Nanomaterials*, 9(10), 1352.

Green, R. A., Baek, S., Poole-Warren, L. A., & Martens, P. J. (2010). Conducting polymer-hydrogels for medical electrode applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 11(1), 014107.

Gupta, S. V. (2014). Viscometry for liquids. *Calibration of Viscometers*, 322.

Haas, J., & Mizaikoff, B. (2016). Advances in mid-infrared spectroscopy for chemical analysis. *Annu. Rev. Anal. Chem*, 9(1), 45-68.

Hiroaki, I., Toyonori, N., & Eiji, T. (2002). Measurement of pesticide residues in food based on diffuse reflectance IR spectroscopy. *IEEE transactions on instrumentation and measurement*, 51(5), 886-890.

Hoła, A., Matkowski, Z., & Hoła, J. (2017). Analysis of the moisture content of masonry walls in historical buildings using the basement of a medieval town hall as an example. *Procedia Engineering*, 172, 363-368.

Hu, L., Zou, L., Liu, Q., Geng, Y., Xu, G., Chen, L., ... & Chen, J. (2022). Construction of chitosan-based asymmetric antioxidant and anti-inflammatory repair film for acceleration of wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 215, 377-386.

Huang, Y., Zhu, C., Yang, J., Nie, Y., Chen, C., & Sun, D. (2014). Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose*, 21(1), 1-30.

Hussain, Z., Sajjad, W., Khan, T., & Wahid, F. (2019). Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review. *Cellulose*, 26(5), 2895-2911.

Iheaturu, N. C., Diwe, I. V., Chima, B., Daramola, O. O., & Sadiku, E. R. (2019). Biopolymers in Medicine. In *Green Biopolymers and their Nanocomposites* (pp. 233-250). Springer, Singapore.

Islam, M. U., Ullah, M. W., Khan, S., Shah, N., & Park, J. K. (2017). Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 1166-1173.

Ismail, B. P. (2017). Ash content determination. In *Food analysis laboratory manual* (pp. 117-119). Springer, Cham.

Jozala, A. F., Pértile, R. A. N., dos Santos, C. A., de Carvalho Santos-Ebinuma, V., Seckler, M. M., Gama, F. M., & Pessoa, A. (2015). Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(3), 1181-1190.

Jung, H., Kim, M. K., Lee, J. Y., Choi, S. W., & Kim, J. (2020). Adhesive hydrogel patch with enhanced strength and adhesiveness to skin for transdermal drug delivery. *Advanced Functional Materials*, 30(42), 2004407.

Kalut, S. A. (2008). Enhancement of degree of deacetylation of chitin in chitosan production (Doctoral dissertation, UMP).

Kačuráková, M., Smith, A. C., Gidley, M. J., & Wilson, R. H. (2002). Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 337(12), 1145-1153.

Khunmanee, S., Jeong, Y., & Park, H. (2017). Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. *Journal of tissue engineering*, 8, 2041731417726464.

Khuri, A. I., & Mukhopadhyay, S. (2010). Response surface methodology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(2), 128-149.

Kirk, R. E. (2012). *Experimental design: Procedures for the behavioral sciences*. Sage Publications.

Koch, M., Tenbohlen, S., Hoehlein, I., & Blennow, J. (2007, August). Reliability and improvements of water titration by the Karl Fischer technique. In *Proceedings of the XVth International Symposium on High Voltage Engineering, ISH, Ljubljana, Slovenia (Vol. 1, No. 5, p. 2)*.

Kucińska-Lipka, J., Gubanska, I., & Janik, H. J. P. B. (2015). Bacterial cellulose in the field of wound healing and regenerative medicine of skin: recent trends and future perspectives. *Polymer Bulletin*, 72(9), 2399-2419.

Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., & Stepnowski, P. (2010). Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine drugs*, 8(5), 1567-1636.

Lavertu, M., Xia, Z., Serreqi, A. N., Berrada, M., Rodrigues, A., Wang, D., ... & Gupta, A. (2003). A validated <sup>1</sup>H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 32(6), 1149-1158.

Le, W., Ting-Ting, L., Xi-Long, W., Gui-Ping, Y., & Shi-Bin, Y. (2015). Chitosan supplementation may improve the digestive physiology and health of captive *Leiostichus xanthurus*. *Avian Biology Research*, 8(4), 221-226.

Leid, J. G., & Shirliff, M. (2009). *The role of biofilms in device-related infections (Vol. 2, pp. 1-44)*. M. Shirliff (Ed.). Berlin, Germany: Springer.

Li, Y., Blank, K. G., Sun, F., & Cao, Y. (2020). Synthesis of novel hydrogels with unique mechanical properties. *Frontiers in Chemistry*, 8, 595392.

Lim, D. J. (2022). Cross-Linking Agents for Electrospinning-Based Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5444.

Liu, S. Q., Joshi, S. C., & Lam, Y. C. (2008). Effects of salts in the Hofmeister series and solvent isotopes on the gelation mechanisms for hydroxypropylmethylcellulose hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*, 109(1), 363-372.

Manzoor, A., Dar, A. H., Pandey, V. K., Shams, R., Khan, S., Panesar, P. S., ... & Khan, S. A. (2022). Recent insights into polysaccharide-based hydrogels and their

potential applications in food sector: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 213, 987-1006.

Massey, B. S., & Ward-Smith, J. (2018). *Mechanics of fluids*. Crc Press.

Meftahi, A., Khajavi, R., Rashidi, A., Sattari, M., Yazdanshenas, M. E., & Torabi, M. (2010). The effects of cotton gauze coating with microbial cellulose. *Cellulose*, 17(1), 199-204.

Mitura, S., Sionkowska, A., & Jaiswal, A. (2020). Biopolymers for hydrogels in cosmetics. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 31, 1-14.

Munck, L. (2007). A new holistic exploratory approach to systems biology by near infrared spectroscopy evaluated by chemometrics and data inspection. *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society*, 21(10-11), 406-426.

Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons.

Nakagaito, A. N., Iwamoto, S., & Yano, H. (2005). Bacterial cellulose: the ultimate nano-scalar cellulose morphology for the production of high-strength composites. *Applied Physics A*, 80(1), 93-97.

Nanjo, F., Katsumi, R., & Sakai, K. (1991). Enzymatic method for determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Analytical Biochemistry*, 193(2), 164-167.

Nielsen, S. S. (2010). Determination of moisture content. In *Food analysis laboratory manual* (pp. 17-27). Springer, Boston, MA.

No HK, Meyers SP (1995) Preparation and characterization of chitin and chitosan—a review. *J Aquat Food Prod Technol* 4:27–52

Pacheco, G., Nogueira, C. R., Meneguim, A. B., Trovatti, E., Silva, M. C., Machado, R. T., ... & Barud, H. D. S. (2017). Development and characterization of bacterial cellulose produced by cashew tree residues as alternative carbon source. *Industrial Crops and Products*, 107, 13-19.

Pacheco, N., Garnica-González, M., Ramírez-Hernández, J. Y., Flores-Albino, B., Gimeno, M., Bázquez, E., & Shirai, K. (2009). Effect of temperature on chitin and

astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource technology*, 100(11), 2849-2854.

Paradee, N., Sirivat, A., Niamlang, S., & Prissanaroon-Oujai, W. (2012). Effects of crosslinking ratio, model drugs, and electric field strength on electrically controlled release for alginate-based hydrogel. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(4), 999-1010.

Park, H., Park, K., & Shalaby, W. S. *Biodegradable hydrogels for drug delivery*. 2011.

Park, J. H., Cho, Y. W., Chung, H., Kwon, I. C., & Jeong, S. Y. (2003). Synthesis and characterization of sugar-bearing chitosan derivatives: aqueous solubility and biodegradability. *Biomacromolecules*, 4(4), 1087-1091.

Pellá, M. C., Lima-Tenório, M. K., Tenório-Neto, E. T., Guilherme, M. R., Muniz, E. C., & Rubira, A. F. (2018). Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. *Carbohydrate polymers*, 196, 233-245.

Phruksaphithak, N., Kaewnun, C., & Sompong, O. (2019). Bacterial cellulose production and applications. *Science, Engineering and Health Studies*, 1-7.

Picchioni, F., & Muljana, H. (2018). Hydrogels based on dynamic covalent and non covalent bonds: a chemistry perspective. *Gels*, 4(1), 21.

Páez-Osuna, F. (2001). The environmental impact of shrimp aquaculture: causes, effects, and mitigating alternatives. *Environmental Management*, 28(1), 131-140.

Ramer, G., & Lendl, B. (2006). Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation*.

Ramya, R., Venkatesan, J., Kim, S. K., & Sudha, P. N. (2012). Biomedical applications of chitosan: an overview. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 2(2), 100-111.

Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (2004). *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. San Diego, California, 162-4.

- Rizzo, F., & Kehr, N. S. (2021). Recent advances in injectable hydrogels for controlled and local drug delivery. *Advanced Healthcare Materials*, 10(1), 2001341.
- Russell, J. D. (1979). Infrared spectroscopy of ferrihydrite: evidence for the presence of structural hydroxyl groups. *Clay minerals*, 14(2), 109-114.
- Sahana, T. G., & Rekha, P. D. (2018). Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering. *Molecular biology reports*, 45(6), 2857-2867.
- Sakr, M. A., Sakthivel, K., Hossain, T., Shin, S. R., Siddiqua, S., Kim, J., & Kim, K. (2022). Recent trends in gelatin methacryloyl nanocomposite hydrogels for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 110(3), 708-724.
- Santos, A., Aw, M. S., Bariana, M., Kumeria, T., Wang, Y., & Losic, D. (2014). Drug-releasing implants: current progress, challenges and perspectives. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(37), 6157-6182.
- Scott, D. W., & Miller, W. H. (2010). *Equine Dermatology-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Shalaby, E. (Ed.). (2017). *Biological activities and application of marine polysaccharides*. BoD–Books on Demand.
- Sharkawy, A., Barreiro, M. F., & Rodrigues, A. E. (2020). Chitosan-based Pickering emulsions and their applications: A review. *Carbohydrate polymers*, 250, 116885.
- Singh, P., Manzoor, K., Ikram, S., & Annamalai, P. K. (Eds.). (2021). *Innovation in Nano-polysaccharides for Eco-sustainability: From Science to Industrial Applications*. Elsevier.
- Soares, M. G., de Lima, M., & Schmidt, V. C. R. (2021). Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 539-550.
- Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives.
- Tapia, O. C., & Ruiz, V. M. (2020). *Bioquímica de los procesos metabólicos*. Reverte.

Teodoro, K. B., Sanfelice, R. C., Migliorini, F. L., Pavinatto, A., Facure, M. H., & Correa, D. S. (2021). A review on the role and performance of cellulose nanomaterials in sensors. *ACS sensors*, 6(7), 2473-2496.

Tong, L., Kang, X., Fang, Q., Yang, W., Cen, S., Lou, Q., & Huang, T. (2022). Rheological properties and interactions of fish gelatin– $\kappa$ -carrageenan polyelectrolyte hydrogels: The effects of salt. *Journal of Texture Studies*, 53(1), 122-132.

Tua, M. F. A. K. (2017). Effects of agitation conditions on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* 0416 in fermentation of matured coconut water medium. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 21(1), 261-266.

Ullah, H., Santos, H. A., & Khan, T. (2016). Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. *Cellulose*, 23(4), 2291-2314.

Ullah, S., Khalil, A. A., Shaukat, F., & Song, Y. (2019). Sources, extraction and biomedical properties of polysaccharides. *Foods*, 8(8), 304.

Ullah, S., Khalil, A. A., Shaukat, F., & Song, Y. (2019). Sources, extraction and biomedical properties of polysaccharides. *Foods*, 8(8), 304.

Vandamme, E. J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., & De Wulf, P. (1998). Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer degradation and stability*, 59(1-3), 93-99.

Von Buelow, S., von Heimburg, D., & Pallua, N. (2005). Efficacy and safety of polyacrylamide hydrogel for facial soft-tissue augmentation. *Plastic and reconstructive surgery*, 116(4), 1137-1146.

Williams, P. A. (Ed.). (2011). *Renewable resources for functional polymers and biomaterials: polysaccharides, proteins and polyesters*. Royal society of chemistry.

Wong, S. S., Jameson, D. M., & Wong, S. S. (2012). *Chemistry of protein and nucleic acid cross-linking and conjugation*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.

Xie, L., Shen, M., Hong, Y., Ye, H., Huang, L., & Xie, J. (2020). Chemical modifications of polysaccharides and their anti-tumor activities. *Carbohydrate Polymers*, 229, 115436.

Xu, Z. (Ed.). (2017). *Solubility of polysaccharides*. BoD–Books on Demand.

Yan, X. L., Khor, E., & Lim, L. Y. (2001). Chitosan-alginate films prepared with chitosans of different molecular weights. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 58(4), 358-365.

Yokoyama, F., Masada, I., Shimamura, K., Ikawa, T., & Monobe, K. (1986). Morphology and structure of highly elastic poly (vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting. *Colloid and Polymer Science*, 264(7), 595-601.

Younes, I., Hajji, S., Rinaudo, M., Chaabouni, M., Jellouli, K., & Nasri, M. (2016). Optimization of proteins and minerals removal from shrimp shells to produce highly acetylated chitin. *International journal of biological macromolecules*, 84, 246-253.

Zargar, V., Asghari, M., & Dashti, A. (2015). A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *ChemBioEng reviews*, 2(3), 204-226.

Zhang, W., Wang, X., Qi, X., Ren, L., & Qiang, T. (2018). Isolation and identification of a bacterial cellulose synthesizing strain from kombucha in different conditions: *Gluconacetobacter xylinus* ZHCJ618. *Food science and biotechnology*, 27, 705-713.

Zhong, Q., Wei, B., Wang, S., Ke, S., Chen, J., Zhang, H., & Wang, H. (2019). The antioxidant activity of polysaccharides derived from marine organisms: An overview. *Marine drugs*, 17(12), 674.

**ANEXOS**