

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
INSTITUTO DE TECNOLOGÍA CELULÓSICA

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del Grado Académico de Doctor en Química.

"APLICACIONES DEL XILANO EN LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE POLIELECTROLITOS PARA LA OBTENCIÓN DE PELÍCULAS Y PARA LA MEJORA DE PROPIEDADES DE PAPELES NO BLANQUEADOS RECICLADOS".

Licenciada Carla Natalí SCHNELL

Directora: Dra. Paulina Mocchiutti – UNL – Santa Fe.

Co-Director: Dr. Miguel Ángel Zanuttini – UNL – Santa Fe.

Miembros del jurado:

-Dra. Mirta I. Aranguren - INTEMA – Facultad de Ingeniería Química (UNMdP)

-Dra. Verónica D. Gonzalez – INTEC – Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL)

-Dr. Marcelo A. Villar – PLAPIQUI – Departamento de Ingeniería Química (UNS)

-2019-

AGRADECIMIENTOS:

La realización de esta Tesis doctoral no habría sido posible sin la valiosa ayuda de mi directora Dra. Paulina Mocchiutti y de mi co-director Dr. Miguel A. Zanuttini. Mi más sincero agradecimiento a ellos, no sólo por la darme la posibilidad de realizar mi doctorado en el Instituto de Tecnología Celulósica, sino también por la confianza depositada en mí, por su ejemplo de trabajo y dedicación, y por haberme hecho sentir muy cómoda a lo largo de este trabajo.

Además, agradezco al Instituto de Tecnología Celulósica de la Facultad de Ingeniería Química por haberme permitido disponer del equipamiento necesario para realizar mis experiencias, a la Facultad de Ingeniería Química y a la Universidad Nacional del Litoral por permitir enriquecer mi formación profesional.

A las siguientes instituciones por su apoyo económico: CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) a través de la Beca Doctoral y el Proyecto PIP 11220120100672; a la ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica) a través del proyecto PICT 2212 y a la Universidad Nacional del Litoral a través del proyecto CAI+D 2016.

También quiero agradecer especialmente a Verónica Galván, Cristina Inalbon y Yamil Solier por su constante ayuda, por su seguimiento y por el aliento brindado día a día.

Además, quiero expresar mi gratitud hacia todo el personal del ITC por su buena predisposición y compañerismo brindado en todo momento.

Un cálido agradecimiento a la Dra. Soledad Peresin por su predisposición y apoyo brindado durante la investigación realizada en Finlandia. Además, quiero agradecer al Centro de Investigación Técnica de Finlandia (VTT), a la Universidad de Aalto (Finlandia) y a sus integrantes quienes también fueron un pilar muy importante durante mi estadía.

A PROVALOR-CYTED por la beca que me fue otorgada para poder realizar una estadía de investigación en el exterior.

Agradezco a los miembros del jurado por su predisposición para leer y corregir esta Tesis.

Y, por último, a todas las personas que me acompañaron durante el curso del doctorado y en esta etapa final. A mis amigas por el continuo aliento y a toda mi familia, en particular a mi mamá y a mi hermana Patricia quienes fueron indispensables para mí.

¡A todos ellos, muchísimas GRACIAS!

RESUMEN

Durante el desarrollo de esta Tesis se obtuvieron y caracterizaron complejos de polielectrolitos naturales (PECs) formados por combinación controlada de un polielectrolito aniónico, el xilano (Xil), y un polielectrolito catiónico, el quitosano (Q). Estos complejos forman una nueva unidad, cuyo comportamiento es diferente a los polielectrolitos simples de partida. Los mismos se utilizaron, por un lado, para obtener películas aptas como material de embalaje y como hidrogeles para la liberación controlada de drogas, y por el otro, como agentes de resistencia en seco de papeles no blanqueados reciclados de coníferas de alta calidad.

Se pretende reemplazar el uso de los polímeros sintéticos y los materiales obtenidos a partir de éstos, por polielectrolitos naturales, renovables y biodegradables como el xilano, el cual proviene de la biomasa lignocelulósica.

Se evaluó el efecto de las condiciones del medio líquido (fuerza iónica, pH) y del orden de agregado de los polímeros en la formación de los complejos de Xil/Q. Se prepararon complejos catiónicos (CatPECs) y aniónicos (AnPECs) y se evaluó el efecto de la fuerza iónica sobre la densidad de carga, distribución de tamaño, potencial zeta y estabilidad coloidal.

Como primera aplicación, se evaluó la capacidad de los PECs catiónicos (CatPECs) para formar películas con propiedades aptas para embalaje. Se evaluaron distintas relaciones de masa de ambos polielectrolitos (relación Xil/Q (%p/p): 70/30, 75/25, 80/20 y 85/15) en las características de los PECs formados y en sus posibilidades de aplicación. Las películas se prepararon por volcamiento/evaporación de las suspensiones de CatPECs. Se evaluó el efecto de la adición de un bajo porcentaje de plastificante (glicerol).

Las películas se caracterizaron principalmente a través de determinaciones de difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido (SEM), solubilidad, propiedades mecánicas, permeabilidad al oxígeno (OP), velocidad de transmisión al vapor de agua (WVTR), estabilidad térmica (TGA) y propiedades antimicrobianas. Además, se evaluó el efecto de la humedad relativa mediante ensayos de análisis mecánico dinámico (DMA) y mediante sorción de vapor de agua (DVS).

A su vez, se analizó la capacidad de estas películas para actuar como hidrogeles sensibles al pH, para su posterior uso en la liberación controlada de fármacos. Se utilizó diclofenaco sódico

como agente activo. Se estudió el efecto del tratamiento de los hidrogeles con un agente de entrecruzamiento iónico y no tóxico como el ácido cítrico/citrato de sodio. Los hidrogeles se caracterizaron mediante capacidad de hinchamiento, solubilidad y propiedades mecánicas. Particularmente se evaluó el comportamiento de estos hidrogeles frente a los cambios de pH y fuerza iónica durante la incorporación y liberación del diclofenaco sódico.

Por otro lado, se analizó la capacidad de adsorción de los CatPECs y AnPECs de Xil/Q sobre una superficie modelo de celulosa nanofibrilar a través de las técnicas de QCM-D (microbalanza de cristal de cuarzo con control de disipación) y SPR (resonancia de plasmones superficiales). Luego, se estudió la capacidad de adsorción de los CatPECs y AnPECs de Xil/Q sobre fibras celulósicas recicladas no blanqueadas y su contribución en la mejora de las propiedades papeleras.

De esta manera, con el estudio de las aplicaciones mencionadas, se pretende ampliar las posibilidades de uso del xilano, y en el caso particular de los hidrogeles, en productos de alto valor agregado.

Estructura general de la Tesis: A continuación, se describen los capítulos desarrollados para la presente Tesis:

- **Capítulo 1:** En este capítulo se encuentra una introducción acerca del tema y los objetivos abordados en este trabajo.
- **Capítulo 2:** Comprende los aspectos generales acerca de los materiales lignocelulósicos, polielectrolitos y complejos de polielectrolitos.
- **Capítulo 3:** Se muestran los resultados de la caracterización de los polielectrolitos y de los complejos de polielectrolitos bajo distintas condiciones de formación.
- **Capítulo 4:** Se caracterizan en profundidad las películas obtenidas a partir de suspensiones de complejos de polielectrolito y los resultados de la caracterización de las películas obtenidas.
- **Capítulo 5:** Comprende los resultados obtenidos de la evaluación de las películas para su uso como hidrogeles en la liberación controlada de droga.
- **Capítulo 6:** Se estudia la adsorción de los complejos de polielectrolitos sobre superficies modelos y se evalúa la capacidad de los mismos como agentes de resistencia para la mejora de propiedades de papeles reciclados para embalaje.
- **Capítulo 7:** Se presenta la conclusión final de todos los resultados obtenidos en este trabajo.
- **Capítulo 8:** Comprende las referencias de las fuentes bibliográficas utilizadas.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. OBJETIVO GENERAL	9
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
2. ASPECTOS GENERALES	13
2.1. MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS	13
2.2. POLIELECTROLITOS	20
2.2.1. Clasificación de los polielectrolitos	21
2.2.2. Grado de ionización de un polielectrolito.....	22
2.2.3. Métodos de caracterización de los polielectrolitos	25
2.3. COMPLEJOS DE POLIELECTROLITOS (PECs).....	28
2.3.1. Mecanismos de formación de PECs	29
2.3.2. Métodos de caracterización de los complejos de polielectrolitos	33
3. PARTE A: CARACTERIZACIÓN DE LOS POLIELECTROLITOS XILANO Y QUITOSANO	39
3.1. MATERIALES.....	39
3.2. MÉTODOS PARA CARACTERIZAR LOS POLIELECTROLITOS	40
3.2.1. Caracterización del xilano	40
3.2.1.1. Determinación de la pureza	40
3.2.1.2. Determinación de la densidad de carga.....	43
3.2.2. Caracterización del quitosano.....	46
3.2.2.1. Determinación de la densidad de carga.....	46
3.3. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LOS POLIELECTROLITOS	48
3.3.1. Determinación de la pureza del xilano	48
3.3.2. Determinación de la densidad de carga del xilano	48
3.3.3. Determinación de la densidad de carga del quitosano	51
3. PARTE B: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE POLIELECTROLITOS .	57
3.4. MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE POLIELECTROLITOS	57
3.4.1. Preparación de los complejos de polielectrolitos.....	57

3.4.2. Monitoreo de la formación gradual de los complejos de Xil/Q mediante medidas de potencial por flujo de cargas.....	57
3.4.3. Monitoreo de la formación gradual de los complejos de Xil/Q mediante medidas de turbidez	58
3.4.4. Preparación de los complejos catiónicos y aniónicos con 30 % de neutralización de cargas (30 %N).....	59
3.4.5. Caracterización de los complejos catiónicos y aniónicos (30 %N) de neutralización de cargas	59
3.4.5.1. Espectroscopia DRIFT	59
3.4.5.2. Determinación de la densidad de carga.....	60
3.4.5.3. Determinación del tamaño de partícula y del potencial zeta	60
3.4.5.4. Determinación de la estabilidad coloidal	61
3.5. RESULTADOS DE LA OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS XILANO/QUITOSANO	62
3.5.1. Monitoreo de la formación gradual de los complejos Xil/Q a través de medidas de potencial por flujo de cargas.....	62
3.5.2. Monitoreo de la formación gradual de los complejos Xil/Q a través de medidas de turbidez	65
3.5.3. Mecanismo propuesto para la formación de complejos de Xil/Q.....	67
3.5.4. Preparación de complejos de polielectrolitos catiónicos y aniónicos con 30 % de neutralización de cargas (30 %N).....	69
3.5.5. Caracterización de los complejos catiónicos y aniónicos (30 %N) de neutralización de cargas	69
3.5.5.1. Espectroscopia DRIFT	69
3.5.5.2. Determinación de la densidad de carga.....	71
3.5.5.3. Determinación del tamaño de partícula promedio.....	72
3.5.5.4. Determinación de la estabilidad coloidal	73
3.6. CONCLUSIONES PARCIALES.....	75
4. OBTENCIÓN DE PELÍCULAS PARA EMBALAJE	79
4.1. INTRODUCCIÓN.....	79
4.2. MATERIALES.....	84
4.3. MÉTODOS.....	84

4.3.1. Determinación del grado de ionización del Xil y del Q en función del pH.....	84
4.3.2. Preparación de las suspensiones de complejos de polielectrolitos catiónicos	86
4.3.3. Obtención de películas a partir de suspensiones de complejos catiónicos.....	86
4.3.4. Caracterización de las películas de Xil/Q	87
4.3.4.1. Permeabilidad al oxígeno (OP)	88
4.3.4.2. Velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR).....	89
4.3.4.3. Solubilidad	90
4.3.4.4. Propiedades mecánicas	90
4.3.4.5. Difracción de rayos X (DRX)	91
4.3.4.6. Estabilidad térmica	92
4.3.4.7. Efecto de la humedad relativa en el módulo de almacenaje.....	92
4.3.4.8. Absorción dinámica de vapor (DVS)	92
4.3.4.9. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	93
4.3.4.10. Efecto antimicrobiano	93
4.4. RESULTADOS	94
4.4.1. Determinación del grado de ionización del Xil y Q en función del pH.....	94
4.4.2. Monitoreo de la adición de Xil sobre solución de Q a pH 5,0. Selección de las de relaciones de masas de Xil/Q específicas.....	97
4.4.3. Caracterización de los complejos de polielectrolitos a las diferentes relaciones de masa	98
4.4.3.1. Determinación de la densidad de carga por titulación polielectrolítica	98
4.4.3.2. Determinación del tamaño de partícula promedio por dispersión de luz dinámica (DLS).....	99
4.4.4. Películas de Xil/Q obtenidas.....	101
4.4.4.1. Mecanismo propuesto de formación de la película	102
4.4.5. Caracterización de las películas	104
4.4.5.1. Propiedades de barrera a los gases (vapor de agua y oxígeno).....	104
4.4.5.2. Solubilidad	106
4.4.5.3. Propiedades mecánicas de las películas. Efecto del glicerol.....	107
4.4.5.4. Difracción de rayos X	112
4.4.5.5. Estabilidad Térmica	113

4.4.5.6. Efecto de la humedad relativa en el módulo de almacenaje.....	115
4.4.5.7. Sorción de vapor dinámica	116
4.4.5.8. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	117
4.4.5.9. Actividad antimicrobiana.....	118
4.5. CONCLUSIONES PARCIALES.....	121
5. HIDROGELES PARA LIBERACIÓN CONTROLADA DE DROGAS	125
5.1. INTRODUCCIÓN.....	125
5.2. MATERIALES.....	131
5.3. MÉTODOS.....	131
5.3.1. Preparación de películas para su uso como hidrogeles.....	131
5.3.2. Tratamiento de las películas con agente de entrecruzamiento iónico.....	132
5.3.3. Caracterización de los hidrogeles	133
5.3.3.1. Análisis mediante FTIR.....	133
5.3.3.2. Morfología por microscopía SEM	133
5.3.3.3. Propiedades mecánicas en húmedo	133
5.3.3.4. Solubilidad y capacidad de hinchamiento.....	134
5.3.3.5. Determinación de ácido cítrico por cromatografía líquida	135
5.3.4. Evaluación de los hidrogeles en la liberación controlada de droga.....	136
5.3.4.1. Incorporación del principio activo.....	136
5.3.4.2. Liberación del principio activo.....	136
5.3.4.3. Efecto del secado y del tamaño del hidrogel	137
5.4. RESULTADOS	137
5.4.1. Caracterización de los hidrogeles	137
5.4.1.1. Análisis por FTIR.....	137
5.4.1.2. Morfología por microscopía SEM.....	139
5.4.1.3. Propiedades mecánicas en húmedo	140
5.4.1.4. Capacidad de hinchamiento y solubilidad.....	142
5.4.2. Evaluación de los hidrogeles como sistema para la liberación controlada de droga	147
5.4.3. Efecto de la fuerza iónica y el pH en el proceso de incorporación y liberación del principio activo sobre el hidrogel tratado con 7% p/v citrato de sodio	152
5.4.4. Mecanismo propuesto de incorporación y liberación de la droga	154

5.4.5. Efecto del secado y del tamaño del hidrogel en la liberación del principio activo....	156
5.5. CONCLUSIONES PARCIALES.....	157
6. ADSORCIÓN DE COMPLEJOS DE POLIELECTROLITOS SOBRE FIBRAS RECICLADAS PARA LA MEJORA DE PROPIEDADES PAPELERA.....	163
6.1. INTRODUCCIÓN.....	163
6.2. MATERIALES.....	168
6.3. MÉTODOS.....	168
6.3.1. Preparación de los complejos de polielectrolitos a pH 6,0.....	168
6.3.2. Caracterización de la adsorción de los complejos de polielectrolitos sobre superficies modelos de celulosa nanofibrilar.....	169
6.3.2.1. Preparación de celulosa nanofibrilar (CNF).....	169
6.3.2.2. Preparación de la superficie modelo de celulosa nanofibrilar (CNF).....	170
6.3.2.3. Monitoreo de la adsorción utilizando una microbalanza de cristal de cuarzo con control de disipación (QCM-D).....	171
6.3.2.4. Monitoreo de la adsorción utilizando resonancia de plasmones superficiales (SPR).....	173
6.3.2.5. Microscopia de fuerza atómica (AFM).....	174
6.3.3. Preparación de la pulpa para los estudios de retención y para la formación de hojas de ensayo.....	175
6.3.3.1. Clasificación cuantitativa de las fibras celulósicas por longitud de fibra.....	175
6.3.4. Caracterización química de la pulpa.....	176
6.3.4.1. Contenido de extractivos.....	176
6.3.4.2. Contenido de lignina insoluble, soluble y cenizas.....	177
6.3.4.3. Determinación de los grupos ácidos totales de las fibras por titulación conductimétrica.....	177
6.3.4.4. Determinación de grupos ácidos superficiales de las fibras por adsorción polielectrolítica.....	178
6.3.5. Determinación de la retención de los PECs sobre fibras celulósicas.....	179
6.3.6. Formación de las hojas de ensayo.....	179
6.3.7. Evaluación de las propiedades papeleras.....	181
6.4. RESULTADOS.....	183

6.4.1. Caracterización de la adsorción de los CatPECs (30%N) y AnPECs (30% N) sobre una superficie modelo de celulosa nanofibrilar.....	183
6.4.1.1. Dinámica de la adsorción de los PECs sobre una superficie modelo de CNF utilizando QCM-D	183
6.4.1.2. Dinámica de la adsorción de los PECs sobre una superficie modelo de CNF utilizando SPR	185
6.4.1.3. Microscopía de fuerza atómica (AFM)	188
6.4.2. Caracterización de la pulpa química no blanqueada reciclada.....	189
6.4.2.1. Clasificación por longitud de fibra.....	189
6.4.2.2. Determinación de extractivos, cenizas y lignina total en la pulpa.....	190
6.4.3.2. Determinación del contenido de grupos ácidos totales de la pulpa.....	191
6.4.3.3. Determinación de los grupos ácidos superficiales de la pulpa	192
6.4.4. Estudio de la retención de los complejos sobre fibra celulósica	192
6.4.5. Formación de las hojas de ensayo y evaluación de las propiedades papeleras	195
6.5. CONCLUSIONES PARCIALES.....	197
7. CONCLUSIONES FINALES	201
ANEXO 1	207
A.1. Determinación de la pureza del xilano.....	207
A.1.1. Determinación del contenido de xilosa mediante cromatografía iónica (HPAEC-PAD)	207
A.1.2. Determinación del contenido de grupos ácido 4-O-metilglucurónicos por método de Scott.....	210
A.1.3. Cálculos para determinar la pureza del xilano	213
ANEXO 2	215
A2.1. Condiciones de caracterización y formación de los complejos de polielectrolitos....	215
CONTRIBUCIONES	217
8. REFERENCIAS	221



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL



1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La biorrefinería integra procesos de producción de combustibles (bioetanol, biogas), energía, y productos químicos a partir de biomasa (NREL 2007). Particularmente, se estima que el mercado mundial de productos químicos obtenidos desde la biomasa aumentará del 2% en 2008 al 22% en el 2025 (Bidy y col. 2016). Entre los productos químicos, merecen ser destacados los polímeros que pueden ser usados para la manufactura de numerosos materiales bio-basados.

Las principales ventajas que presenta la biorrefinería respecto a la refinería de petróleo son:

- uso de biomasa como materia prima, la cual es un recurso renovable.
- balance de emisión de CO₂ más cercano a la neutralidad que contribuye a la reducción del efecto invernadero del planeta.
- posibilidad de usar residuos agroindustriales como materia prima, lo que implica una reducción de los mismos.
- los productos biobasados que se obtienen son en general más biodegradables o compostables, con lo cual se contribuye a facilitar la disposición de desperdicios urbanos (Garrison y col. 2016; European Bioplastic 2016).
- la biocompatibilidad de algunos biomateriales permite considerar aplicaciones valiosas como pueden ser las farmacológicas o biomédicas (Pillai y col. 2009; Yadav y col. 2015; Garrison y col. 2016).

Particularmente, la biomasa lignocelulósica es un potencial prometedor para las biorrefinerías debido a que es la fuente renovable más abundante en la naturaleza (Özdenkçi y col. 2017). No obstante, en la actualidad el consumo anual de biomasa lignocelulósica en las industrias es relativamente pequeño en comparación con la disponibilidad total (Hassan y col. 2019).

De acuerdo con Hassan y col. (2019), 224 biorrefinerías ya se encontraban operando en toda Europa en el año 2017, además de varias en construcción. Dentro de las mismas, sólo 43 biorrefinerías utilizan materias primas lignocelulósicas, y son las llamadas de “segunda generación”. Es por ello que, con el objetivo de estimular el desarrollo de las biorrefinerías basadas en materiales lignocelulósicos, la Unión Europea ha financiado muchos proyectos bajo el Programa “Horizonte 2020”.

Las materias primas lignocelulósicas se pueden clasificar en: materias primas madereras (coníferas y latifoliadas) y materias primas no madereras (gramíneas, otras). Estas materias primas están constituidas por fibras celulósicas que contienen mayoritariamente compuestos poliméricos de alto peso molecular como la celulosa, hemicelulosas y lignina, y compuestos minoritarios de bajo peso molecular, como son los extractivos y cenizas. En el capítulo 2 de esta Tesis se describe en detalle la clasificación y composición química de estas materias primas.

Particularmente, las hemicelulosas son polisacáridos de peso molecular relativamente bajo (respecto a la celulosa), y se consideran un producto secundario de la industria forestal y de la industria papelera (Stepan 2013). No obstante, en los últimos años con el objetivo de aprovecharlas y encontrarles distintas aplicaciones se han estudiado numerosas técnicas de extracción de las mismas.

Hasta el momento sólo se han instalado plantas a escala piloto para separar y aislar hemicelulosas del resto de la matriz lignocelulósica (Gatenholm y Tenkanen, 2004; Testova y col. 2014). Esto se debe principalmente a que el aislamiento, la purificación y la conversión final al producto de interés, hacen que el proceso sea costoso (Testova y col. 2014). Pese a esto, dadas las potenciales diversas aplicaciones valiosas de las mismas y a la posibilidad de utilizarlas, en algunos casos, sin necesidad de numerosas etapas de purificación, la obtención a escala industrial puede llegar a ser factible.

Se han utilizado varios métodos para extraer las hemicelulosas de los materiales lignocelulósicos. Entre ellos se encuentran: la hidrólisis ácida y tratamientos hidrotérmicos como

la autohidrólisis. En esta última, se utiliza agua presurizada y temperaturas mayores a 120°C para lograr una depolimerización. Otros métodos de extracción son la explosión de vapor, la oxidación húmeda; y tratamientos alcalinos ya sea mediante el uso de NaOH, Ca(OH)₂, NaOH + H₂O₂ o NH₃ (Carvalho y col. 2008).

Las características finales de las hemicelulosas dependerán del método de extracción, y la selección del mismo dependerá en gran medida de la aplicación final de las mismas. Por ejemplo, si las hemicelulosas extraídas se dirigen a la producción de bioetanol, entonces se requiere la forma monomérica de azúcares y, por lo tanto, se puede preferir utilizar ácido diluido o una hidrólisis térmica. Otras aplicaciones como la obtención de películas e hidrogeles, requieren preservar en lo posible el peso molecular original del polímero. Según diferentes autores (Svärd y col. 2017, Brienza y col. 2009, Júnior y col. 2013), las extracciones alcalinas son las más efectivas para este segundo caso.

Dentro de las hemicelulosas, uno de los polisacáridos más estudiados son los comúnmente llamados "xilanos". Éstos constituyen entre un 5-10% de la masa seca de las coníferas, 20-30% de las latifoliadas, y hasta un 40% de las gramíneas (Stokke y col. 2013).

Particularmente, en esta Tesis se utilizaron xilanos extraídos de madera de haya (latifoliada). En este tipo de materia prima, la cadena de xilano está basada en un esqueleto lineal compuesto por unidades β-D xilopiranosas unidas por enlaces (1→4) (**Figura 1.1**), sustituidas por 1 grupo ácido 4-O-metil glucurónico y 3,5-7 grupos acetilos cada 10 unidades de xilosa (Sjöström 1993). Debido a la presencia de los sustituyentes ácidos glucurónicos en su estructura, los xilanos se consideran polielectrolitos aniónicos y débiles.

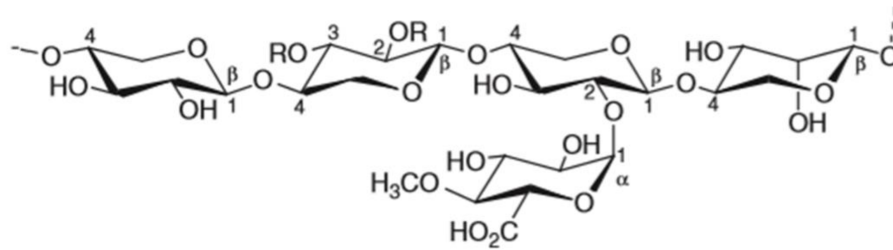


Figura 1.1. Estructura química de los 4-O-metilglucuronoxilanos presentes en las maderas de latifoliadas. (R: CH₃CO o H) (Extraído de Stokke y col. 2013).

En la **Figura 1.2** se presentan algunos de los productos que se pueden derivar del xilano extraído de la biomasa lignocelulósica como son los productos de fermentación como el xilitol, utilizado como ingrediente de gomas de mascar, pastas dentales y en productos para diabéticos, los xilo-oligosacáridos que se pueden aplicar como prebióticos, o el xilano polimérico que puede utilizarse para la obtención de películas para embalaje.

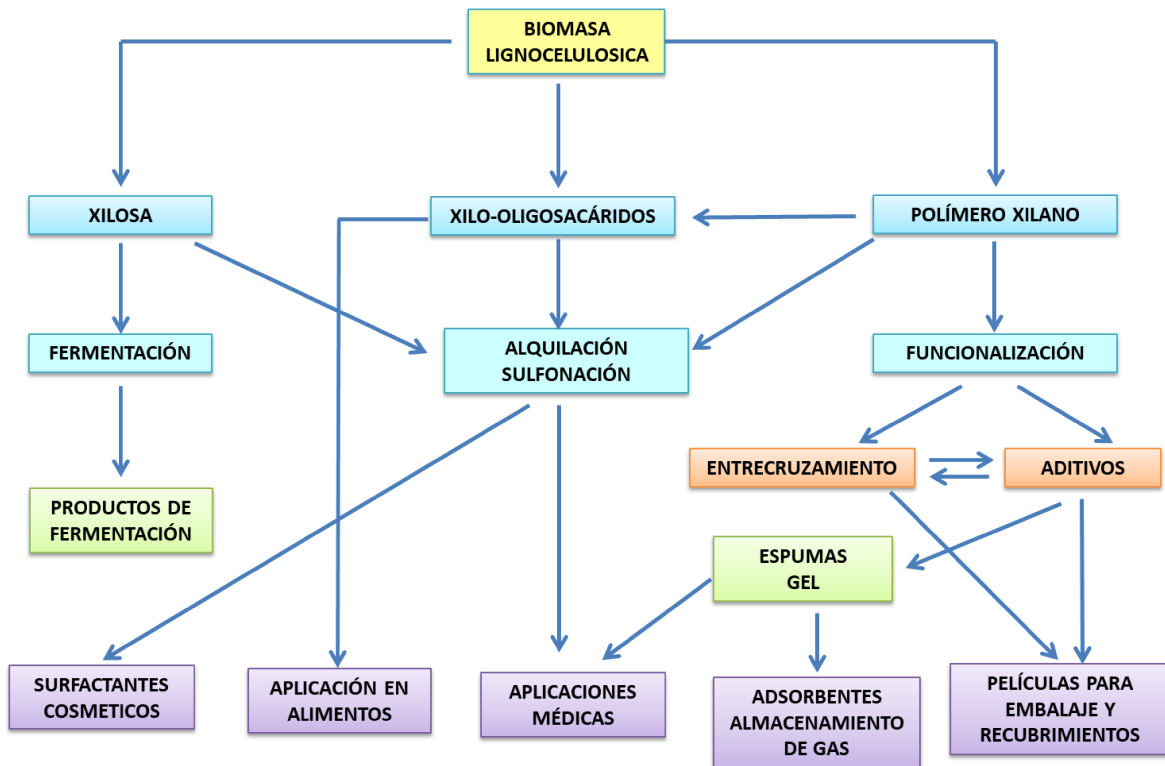


Figura 1.2. Productos basados en xilano extraído de materiales lignocelulósicos. (Extraído de Deutschmann y Dekker, 2012).

Particularmente, la demanda de materiales de embalaje biodegradables para reemplazar los polímeros sintéticos tradicionales ha aumentado significativamente en los últimos años. Si bien actualmente los materiales obtenidos de fuentes renovables son en general, más caros que los polímeros a base de combustibles fósiles, cada vez se hace más hincapié en su comercialización.

Para que las películas basadas en xilano puedan reemplazar a algunas de las películas sintéticas, dependiendo de su aplicación final, se requiere que cumplan con determinadas propiedades. Estas propiedades pueden ser: térmicas, mecánicas, propiedades de barrera a distintos gases, entre otras.

Es conocido que las películas obtenidas a partir de xilano solo, son quebradizas y difíciles de manejar debido a su bajo peso molecular y a su alta temperatura de transición vítrea (T_g : 180°C). La baja solubilidad en agua de los xilanos es otra limitante (Gabriellii y col. 2000; Gröndahl y col. 2004). Sin embargo, el agregado de plastificantes, o la combinación adecuada del xilano con otro polímero de carga opuesta, para formar complejos de polielectrolitos (PECs) podrían ser alternativas para obtener películas con propiedades mecánicas aceptables.

Particularmente, la formación de PECs permite explotar las ventajas individuales de los polielectrolitos y la creación de una nueva unidad nanoestructurada (Ankerfors y Wågberg, 2014) con propiedades diferentes a los polímeros de partida. Además, los PECs pueden adoptar diferentes estructuras dependiendo del pH y la concentración de sal del medio líquido y la concentración de los polímeros, entre otros factores. Por lo tanto, la obtención de PECs para una posterior aplicación en materiales de embalaje requiere de un estudio exhaustivo de las variables presentes que modifiquen su formación y comportamiento. En el capítulo 2 de esta Tesis se discute en profundidad acerca de la obtención y caracterización de los polielectrolitos, y de los complejos de polielectrolitos.

Diversos autores han combinado el xilano con otros polímeros para formar películas para embalaje. Por ejemplo, Kayserilioglu y col. (2003) obtuvieron películas con un 40% de xilano y un

60% de gluten de trigo que presentaron valores de resistencia a la tracción (9 MPa) y a la elongación (9,5%) aceptables. Otros autores han preparado películas mezclando polvos de xilano y quitosano, seguido de una disolución en medio ácido y evaluaron con éxito su capacidad para actuar como hidrogel (Gabrielli y col. 2000).

No obstante, de acuerdo con nuestros conocimientos, la obtención de películas a partir de suspensiones de complejos de polielectrolitos naturales obtenidos por combinación de xilano, como componente mayoritario, con otro polielectrolito natural y catiónico como el quitosano en un medio a pH y fuerza iónica adecuada, no ha sido estudiado en detalle.

El quitosano (**Figura 1.3**), es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza luego de la celulosa (Lim y Hudson 2004). Su estructura química está basada en unidades de β -1,4 glucosamina y N-acetil-glucosamina distribuidas aleatoriamente. Es un polielectrolito catiónico, renovable, presenta actividad antimicrobiana, no es tóxico y es biodegradable (Lim y Hudson 2004). Presenta además excelentes propiedades de biocompatibilidad y buena capacidad de formación de películas en medio ácido (Kim y col. 2006).

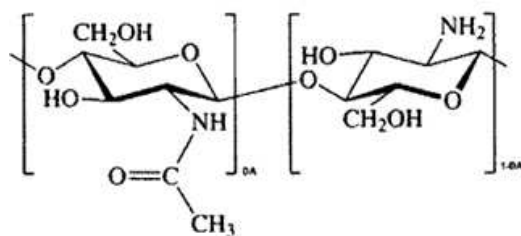


Figura 1.3. Estructura química del quitosano, obtenido por deacetilación de la quitina (Extraído de Pontius 2016).

El quitosano es un derivado de la quitina, la cual se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos y además en las paredes celulares de hongos, insectos y levaduras (Plackett 2011).

La obtención del quitosano comienza con el procesamiento del caparazón de crustáceos que implica principalmente la eliminación de proteínas y la disolución del carbonato de calcio que está presente en altas concentraciones. La quitina resultante se deacetila en hidróxido de sodio al 40%p/p a 120°C. La deacetilación es un paso clave en el proceso de producción del quitosano

y consiste en la transformación del grupo acetamida (NHCOH_3) en amina (NH_2) por reacción con una base (Alcalde y Fonseca, 2016) (**Figura 1.4**). Estos grupos aminos son los responsables de la cationicidad final del polímero y además le proporcionan al polímero una solubilidad restringida solo al medio ácido. El grado de deacetilación (*DA*) normalmente es alrededor de 70% (Kumar 2000). Así, el tamaño de las cadenas de quitosano y la conformación que adquieren en soluciones diluidas dependerán en gran medida del grado de deacetilación y de la fuerza iónica del medio (Schatz y col. 2004).

Schatz y col. (2004) estudiaron las propiedades fisicoquímicas del quitosano en solución en función del grado de deacetilación. Observaron que cuando el *DA* del quitosano se encuentra por encima del 80%, las interacciones electrostáticas predominan, y el quitosano se comporta como un polielectrolito catiónico. En cambio, para un *DA* inferior al 50%, las asociaciones de las cadenas poliméricas conducen a la formación de agregados estables que puede deberse a las interacciones hidrofóbicas que se producen por el alto contenido de grupos acetilos.

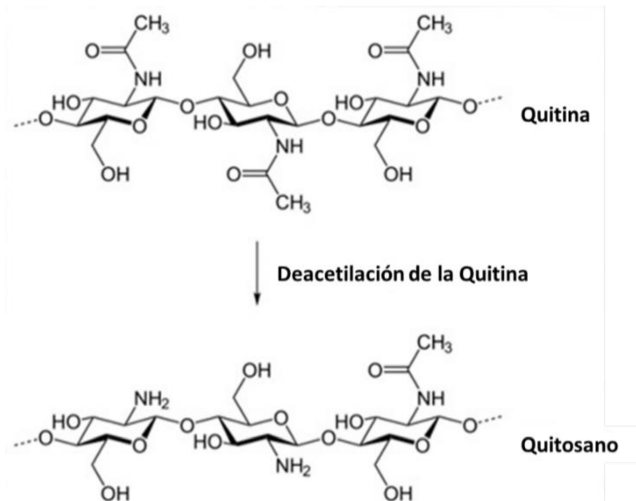


Figura 1.4. Estructura química del quitosano, obtenido por deacetilación de la quitina (Extraído de Berezina 2016).

Las películas basadas en complejos de xilano/quitosano, conteniendo altas proporciones de xilano, también pueden encontrar aplicación como hidrogeles para la liberación controlada de droga.

Los hidrogeles se definen como redes de polímeros entrecruzados que tienen la capacidad de hincharse sin disolverse en agua. Tienen una amplia aplicación en medicina como sistemas de liberación controlada y/o sostenida de principios activos, dispositivos para diagnóstico, membranas para hemodiálisis, sistemas terapéuticos biodegradables, sustrato para el cultivo de células, geles para electroforesis, desintoxicantes sanguíneos, lentes de contacto e implantes (Zaldívar y col. 1993).

Particularmente, los hidrogeles que responden al pH (*pH-sensitive hydrogels*) han recibido una considerable atención como sistemas de administración controlada de droga, no sólo porque pueden proteger al agente terapéutico contra la desnaturalización ácida en el estómago y reducir el efecto nocivo de los mismos, sino también porque pueden prolongar el tiempo de residencia en el organismo tratado y de esta manera reducir la frecuencia de dosificación (Sun y col. 2013).

Debido a la excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad de los polímeros naturales, se han utilizado una gran variedad de polisacáridos naturales para preparar hidrogeles como sistemas inocuos de liberación controlada para la administración de fármacos. Particularmente, el xilano ha sido considerado como una materia prima adecuada para producir sistemas de administración colónica de fármacos, ya que no es biodegradado en el intestino delgado, pero sí luego por enzimas producidas por la microflora colónica (Ebringerova y Hromadkova, 1999).

Por otro lado, en la industria papelera, existen numerosos ejemplos de sustancias que se utilizan como agente de resistencia en seco. Éstos son principalmente polielectrolitos catiónicos ya que las fibras celulósicas tienen carga aniónica (Eklund y Lindström 1991). El polielectrolito catiónico más utilizado es el almidón catiónico, sin embargo, el dosaje máximo que puede aplicarse es limitado (Hubbe y col. 2012), y pueden aumentar la resistencia del papel hasta un cierto valor máximo.

En los últimos años, varias investigaciones se han focalizado en lograr extraordinarias mejoras en propiedades de resistencia del papel agregando complejos de polielectrolitos (PECs)

(Gärdlund y col. 2005; Lofton y col. 2005; Fatehi y col. 2009). Estos PECs se forman de manera que presenten un exceso de carga catiónica para lograr su adsorción sobre las fibras celulósicas.

Particularmente en nuestro grupo de trabajo se ha estudiado en detalle el comportamiento de los complejos de polielectrolitos sintéticos de poli (cloruro de alilamina) / poli (ácido acrílico) (PAH/PAA) y de complejos de PAH y Xilano (PAH/Xil) en la adsorción sobre distintas superficies (Galván y col. 2015), así como los efectos sobre las propiedades mecánicas de papeles marrones de alta calidad (Mocchiutti y col. 2015). Se encontró que ambos complejos aumentaron considerablemente las propiedades papeleras en comparación a los valores logrados con la adición de PAH solo, pero resultó más atractivo el uso de un polielectrolito natural como el xilano.

Resulta interesante entonces, estudiar el efecto de los complejos de polielectrolitos formados por dos polielectrolitos naturales como el xilano y quitosano sobre las propiedades papeleras de fibras recicladas no blanqueadas.

En base a lo expuesto, se presentan los objetivos propuestos en esta Tesis:

1.1. OBJETIVO GENERAL

Alcanzar un mejor conocimiento del comportamiento de complejos de polielectrolitos (PECs) de xilano/quitosano (Xil/Q) durante su formación y evaluar, por un lado, su capacidad para formar películas a para ser usadas como material de embalaje y como hidrogeles para liberación controlada de fármacos y, por el otro, evaluar su capacidad para ser usados como agentes de resistencia en papeles no blanqueados reciclados de coníferas de alta calidad. De esta manera se pretende ampliar las posibilidades de aplicación del xilano.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar y caracterizar complejos de polielectrolitos de Xil/Q variando la fuerza iónica del medio (0,01N y 0,1N NaCl) y el orden de agregado de los mismos. Evaluar su formación

mediante medidas de potencial por flujo de cargas y mediante medidas de turbidez. Caracterizarlos a través de mediciones de tamaño de partícula, densidad de carga y medidas de estabilidad coloidal.

- Obtener películas mecánicamente resistentes, manipulables, con buenas propiedades de barrera a los gases y aptas para ser usadas en embalaje, a partir de suspensiones de complejos de polielectrolitos catiónicos de Xil/Q, utilizando distintas relaciones de masa. Estudiar el efecto del agregado de una baja cantidad de glicerol como plastificante.

- Evaluar la capacidad de las películas de Xil/Q para su uso como hidrogeles con aceptable resistencia mecánica y alta capacidad de hinchamiento. Evaluar el efecto del tratamiento de estas películas con distintas cantidades de citrato de sodio como agente de entrecruzamiento iónico. Evaluar la capacidad de incorporación de droga de los hidrogeles con y sin agente de entrecruzamiento iónico, empleando diclofenaco sódico como droga modelo. Evaluar la capacidad de los hidrogeles como sistemas para la liberación controlada de droga en diferentes condiciones de pH y fuerza iónica.

- Evaluar el uso de los complejos de polielectrolitos de Xil/Q como agentes de resistencia en seco y en húmedo para la mejora de las propiedades del papel reciclado no blanqueado de alta calidad para su uso en embalaje. Caracterizar la adsorción de los complejos de polielectrolitos sobre superficies modelo, utilizando microbalanza de cristal de cuarzo con control de disipación (QCM-D) y resonancia de plasmones superficiales (SPR). Evaluar el efecto del orden de agregado de los polielectrolitos en la formación de los complejos sobre el mecanismo de adsorción sobre las superficies modelos y sobre las fibras celulósicas.



CAPÍTULO 2

ASPECTOS GENERALES



2. ASPECTOS GENERALES

2.1. MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

Los materiales lignocelulósicos son una fuente principal para la obtención de materiales, biocombustibles y productos químicos a partir de la biomasa. El término lignocelulosa hace referencia a la sustancia estructural producida por las plantas en crecimiento que forma la base de las paredes celulares de las mismas.

Las materias primas lignocelulósicas se pueden clasificar en:

- materias primas madereras:
 - Gimnospermas: coníferas o maderas blandas (como el pino, abeto y araucarias).
 - Angiospermas dicotiledóneas: latifoliadas o maderas duras (como el haya, álamo, abedul).
- materias primas no madereras:
 - Angiospermas monocotiledóneas: gramíneas (caña de azúcar, arroz, trigo, pasto varillas).
 - Angiospermas dicotiledóneas: como el lino, algodón, etc.

Estas materias primas están constituidas por fibras celulósicas cuya química es altamente compleja debido principalmente a la variedad de componentes químicos que las forman y a su complejo ensamblaje. Además, la composición química varía según: tipo de material lignocelulósico (coníferas, latifoliadas, etc.), especie, ubicación en el tallo, ubicación dentro de la pared celular, grado de desarrollo del vegetal, etc.

La **Tabla 2.1** muestra la composición química general de materias primas lignocelulósicas madereras y no madereras. Se puede observar que la pared celular de las fibras celulósicas está constituida principalmente por polímeros de alto peso molecular como la celulosa, las hemicelulosas y la lignina. Además, posee en menor medida, otros componentes no

poliméricos como los extractivos (material orgánico) y cenizas (material inorgánico), que corresponden a los procesos fisiológicos de la célula. Particularmente en las materias primas no madereras también podría encontrarse hasta un 5% de proteínas.

Tabla 2.1. Composición química de materias primas lignocelulósicas madereras y no madereras (Stokke y col. 2013).

Componentes	Materias primas madereras % de la masa seca	Materias primas no madereras % de la masa seca
Celulosa	40-45	30-45
Hemicelulosa	25-35	20-35
Lignina	20-30	10-25
Extractivos	2-5	5-15
Cenizas	0,1-1	0,5-10

A continuación, se describen los principales componentes de las fibras celulósicas y su organización física en la pared celular:

-Celulosa

La molécula de celulosa es el componente que se encuentra en mayor proporción en el material fibroso, es un homopolisacárido lineal de alto peso molecular, constituido por unidades D-glucosa con una estructura de anillo piranósico, unidas entre sí por enlaces β -1,4 glucosídicos (**Figura 2.1**). Se puede observar en la figura que cada unidad de glucosa presente en el polímero rota 180° respecto de la siguiente unidad. Este tipo de enlace, la conformación de silla piranósica y la orientación ecuatorial de los hidroxilos sustituyentes en C_2 , C_3 , y del grupo $-CH_2OH$ son los motivos por los cuales las cadenas de celulosa son lineales y pueden asociarse ordenadamente. Además, entre las cadenas se producen enlaces puente de hidrógeno intermolecular, así como también intramolecular, formando estructuras empaquetadas de tipo cristalino y de características fibrosas. Aproximadamente 40 moléculas de celulosas apareadas lateralmente forman las fibrilas elementales de 35-40 Å de diámetro. Éstas se unen para formar entidades mayores llamadas

microfibrillas de 100-300 Å de diámetro (**Figura 2.2 a**). Estas microfibrillas se depositan con diferentes orientaciones en las distintas capas de la pared celular.

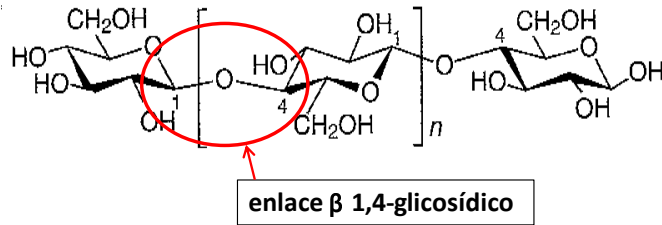


Figura 2.1. Estructura química de la celulosa (Extraído de Stokke y col. 2013).

Si bien la organización de las microfibrillas no es la de un cristal puro, las moléculas de celulosa forman regiones completamente ordenadas o cristalinas, las cuales son difíciles de penetrar por disolventes y reactivos, y dan rigidez a la fibra. También forman zonas desordenadas o amorfas, que son químicamente más accesibles y aportan flexibilidad a la fibra. Este cambio de la región cristalina a la amorfa no está claramente definido.

En la **Figura 2.2 b**) se muestra que las microfibrillas se encuentran estrechamente asociadas al segundo polímero principal de la pared celular, las hemicelulosas, que a su vez se encuentran covalentemente unidas y encerradas por la lignina.

Stokke y col. (2013), describen de forma resumida a la pared celular de materias primas madereras como: “un material de alta resistencia a la tracción (celulosa), rodeado por un material higroscópico (hemicelulosa) y embebido en una matriz termoplástica (lignina)”.

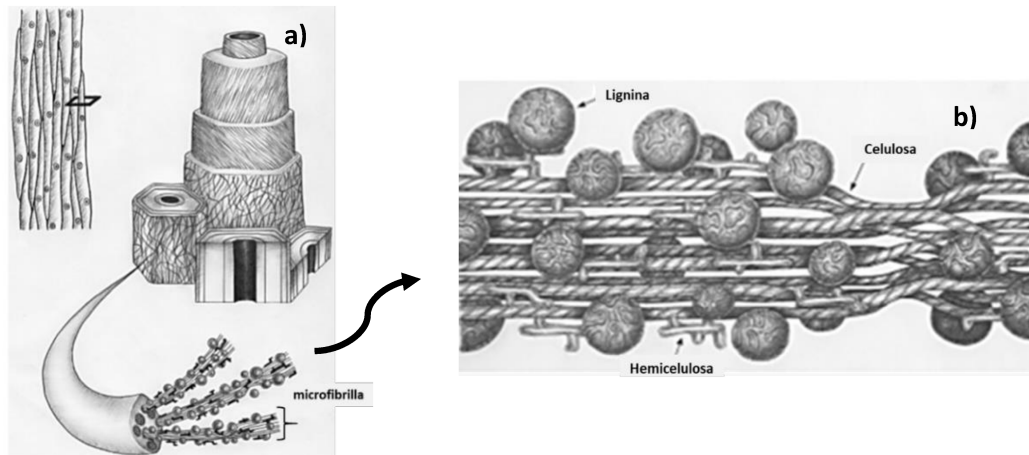


Figura 2.2. a) Estructura de la pared celular de materias primas madereras. Las fibrillas de celulosa se agregan para formar una microfibrilla y estas a su vez forman la ultraestructura de la pared celular b) microfibrillas de celulosa asociadas a las hemicelulosas y lignina (Extraído de Stokke y col. 2013).

- Hemicelulosas

Las hemicelulosas se consideran como el segundo biopolímero más abundante del reino vegetal. Están en estrecha asociación con la celulosa en la pared celular mediante puentes de hidrógeno, rodeando a las microfibrillas y entrelazándolas entre sí para formar una red o matriz.

Son un grupo heterogéneo y ramificado de polisacáridos formados por unidades de azúcar piranosas y furanosas, que incluyen D-xilosa, D-manosa, L-arabinosa, D-glucosa, ácido D-glucurónico y ácido D-galacturónico (**Figura 2.3**). Son polímeros relativamente cortos (D.P. de las hemicelulosas: 100- 200, mucho menor al de la celulosa) y tienen una estructura más abierta que la celulosa, son más higroscópicas y son considerablemente más solubles que la celulosa.

Es de destacar que la cadena de xilano tiene una fuerte similitud con la cadena de celulosa, particularmente cuando los grupos acetilos de los xilanos son removidos. En el xilano, los monómeros también se encuentran alternados 180° uno respecto del otro, dando lugar a una cadena lineal y, además, los sustituyentes OH en la xilosa están en posición ecuatorial. Ambas características sugieren la posibilidad de formación de zonas cristalinas.

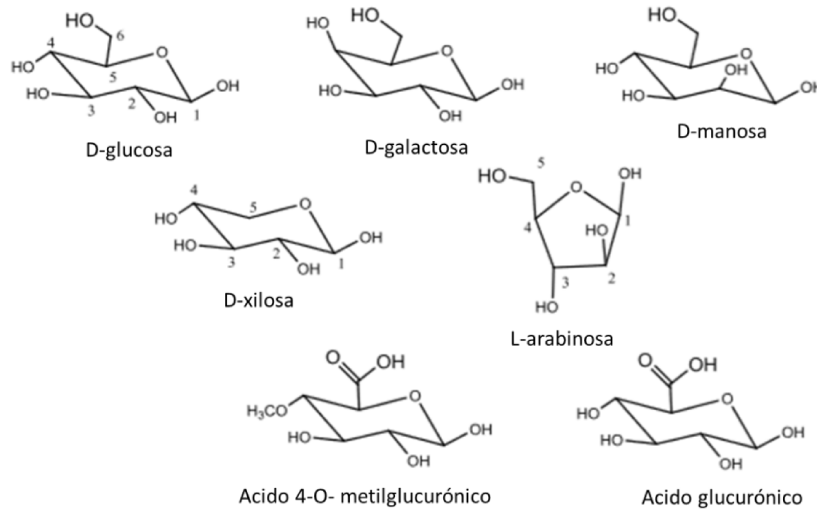


Figura 2.3. Unidades monoméricas de azúcar más comunes de las hemicelulosas. (Extraído de Stepan 2013).

-Hemicelulosas en coníferas

Las hemicelulosas de coníferas consisten principalmente de galactoglucomananos (alrededor del 15-20% masa seca) (**Figura 2.4**) y arabinoglucuronoxilanos. Los glucomananos consisten de un esqueleto lineal de unidades glucopiranosas y manopiranosas, que están parcialmente acetiladas (grupos -CH₃CO), con alrededor un grupo acetilo cada 3-4 unidades de hexosas. Los glucomananos varían en la relación galactosa:glucosa:manosa. Por otro lado, el esqueleto de los arabinoglucuronoxilanos está comprendido por unidades xilosas las cuales no están acetiladas. Los ácidos glucurónicos son la principal fuente de grupos carboxílicos en las maderas y pulpas de coníferas.

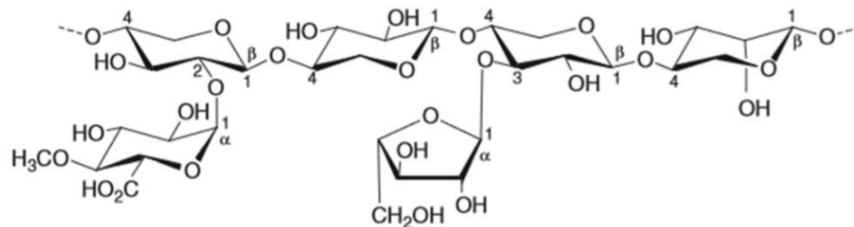


Figura 2.4. Estructura química del principal componente de las hemicelulosas de las maderas de coníferas: los galactoglucomananos (Extraído de Stokke y col. 2013).

-Hemicelulosas en latifoliadas

Las hemicelulosas de latifoliadas consisten principalmente de glucuronoxilanos, alrededor del 20-30% del peso seco de la madera, y de glucomananos (<5% de la madera seca). En los glucuronoxilanos, la cadena de xilano está sustituida por 1 grupo ácido 4-O-metil glucurónico y 3,5 a 7 grupos acetilos cada 10 unidades de xilosa (Sjöström 1993) (**Figura 2.5**, ya mostrada en el capítulo 1). Los glucomananos de las latifoliadas no se encuentran sustituidos y no están acetilados.

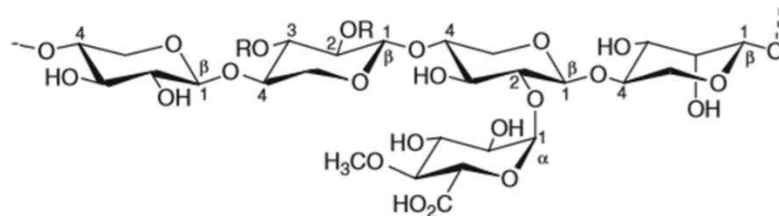


Figura 2.5. Estructura química de los 4-O-metilglucuronoxilanos presentes en las maderas de latifoliadas. (R: CH₃CO o H) (Extraído de Stokke y col. 2003).

-Hemicelulosas en gramíneas

En las gramíneas como el bagazo de caña de azúcar, la principal hemicelulosa son los arabinoglucuronoxilanos (también llamados xilanos), que poseen además sustituyentes arabinosa y presentan también ácido ferúlico o ácido p-cumarico esterificado a la cadena (Banerjee y col. 2014) (**Figura 2.6**).

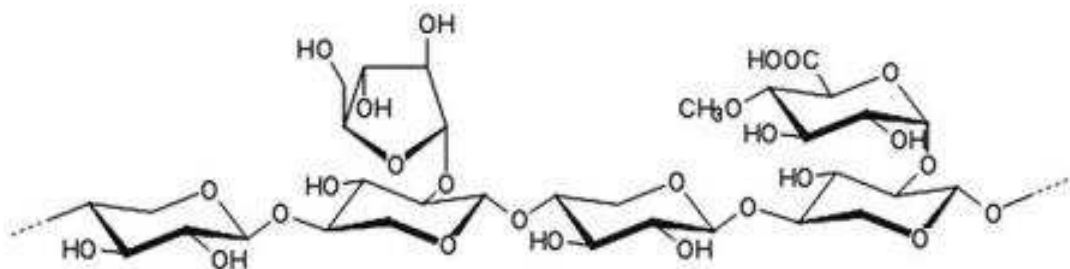


Figura 2.6. Estructura química de los xilanos presentes en el bagazo de caña de azúcar (arabinoglucuronoxilanos) (Sustituyentes: arabinosa y ác. glucurónico) (Extraído de Heinze y col. 2012).

- Lignina

La lignina es un polímero amorfo, hidrófobo, de estructura completamente irregular y tridimensional. Está compuesta por unidades fenilpropano (estructuras C9) unidas entre sí en general por enlaces éter o carbono-carbono.

La lignina tiene la función de mantener unidas a las fibras, darles rigidez y protegerlas del ataque químico y físico. Debido a que no es posible aislar la lignina cuantitativamente desde la madera sin degradación química o física, no se conoce su masa molecular verdadera.

La lignina de maderas de coníferas está constituida principalmente por unidades G (guaiacil), y la presente en maderas de latifoliadas está constituida por unidades G y S (siringil) (**Figura 2.7**) y en las plantas no madereras las ligninas contienen las tres unidades G, S y H (p-hidroxifenil) en proporciones muy variables.

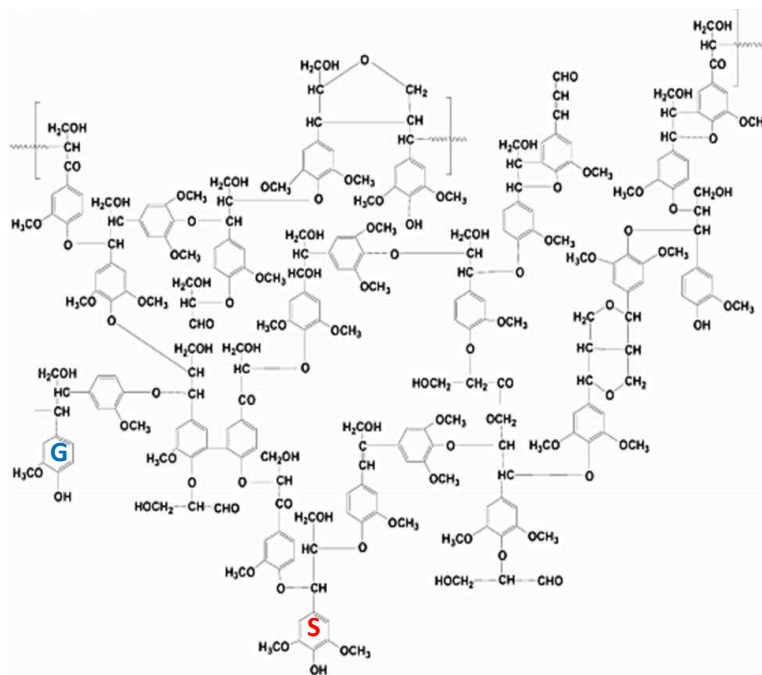


Figura 2.7. Estructura parcial de lignina de madera de latifoliada (Extraído de Brebu y Vasile 2010). Se muestran una unidad G y S.

- Extractivos y compuestos inorgánicos

Además de la celulosa, la hemicelulosa y las ligninas, las células de las plantas contienen muchas otras moléculas orgánicas como pectinas, proteínas, taninos, ceras, compuestos

aromáticos y carbohidratos de bajo peso molecular (Stokke y col. 2013). Estos materiales no forman la estructura fundamental de la pared celular, pero sí tienen un profundo efecto sobre la naturaleza química de los materiales lignocelulósicos.

Las paredes celulares de las plantas también contienen sustancias inorgánicas como el calcio y la sílice. Estas cenizas provienen de depósitos de sales como carbonatos, silicatos, oxalatos y fosfatos presentes en la pared celular y en los lúmenes. Los iones metálicos más abundantes son el calcio, seguido de potasio y magnesio.

2.2. POLIELECTROLITOS

Durante las últimas décadas, los polielectrolitos (PE) se han convertido en uno de los temas de investigación científica más atractivos debido a su gran potencial en diversas áreas como en los de tecnología avanzada y en biología molecular (Meka y col. 2017).

En la actualidad, se utilizan en muchas aplicaciones principalmente relacionadas con la estabilidad de las suspensiones acuosas. Por ejemplo, pueden usarse para desestabilizar una suspensión coloidal e iniciar la floculación. También se pueden utilizar para impartir una carga superficial a partículas neutras, lo que permite que se dispersen en solución acuosa. Por lo tanto, los polielectrolitos son tanto floculantes como defloculantes. Se utilizan en el tratamiento del agua (Bolto y Gregory, 2007) y para la recuperación del petróleo. Muchos jabones, champús y cosméticos incorporan polielectrolitos. Además, se agregan a muchos alimentos. Algunos de los polielectrolitos que aparecen en las etiquetas de los alimentos son pectina, carragenina, alginatos y carboximetilcelulosa.

Los polielectrolitos se definen como macromoléculas que poseen un número relativamente elevado de grupos funcionales ionizables. Al colocar estas macromoléculas en algún disolvente polar (por ejemplo, H₂O) estos grupos pueden dissociarse, dejando cargas en las cadenas de los polímeros y liberando sus contraiones a la solución (Dobrynin y Rubinstein, 2005). La carga de los PE es neutralizada por sus contraiones de manera de preservar la neutralidad

electrónica. Es decir, en una solución que contiene un PE, con carga positiva, irá acompañada de un ion con carga negativa. De manera similar, los materiales cargados negativamente pueden ir acompañados de pequeños iones cargados positivamente (Meka y col. 2017) (**Figura 2.8**).

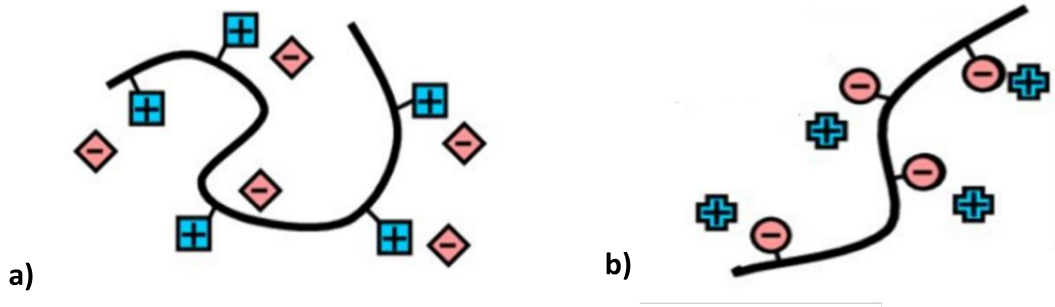


Figura 2.8. Representación de a) PE catiónico y b) PE aniónico en solución con sus respectivos contraiones (Extraído de Hubbe y col. 2012).

Si el grupo funcional es débil, la fuerza motriz para que ocurra el proceso de disociación de los polielectrolitos en un medio acuoso es el aumento de la entropía del sistema. Ésta se opone al potencial electroquímico que atrae a los contraiones de carga opuesta a las cadenas de polielectrolitos (Koetz y Kosmella, 2007).

2.2.1. Clasificación de los polielectrolitos

La **Figura 2.9** muestra las principales clasificaciones de los polielectrolitos. Éstos pueden ser naturales, como las proteínas y los ácidos nucleicos, o pueden ser sintéticos, como el polivinilsulfato, polietilenimina, poli (ácido acrílico), entre otros. Además, pueden clasificarse convenientemente como aniónicos, catiónicos o anfóteros, según si el polímero ionizado tiene cargas negativas, cargas positivas o ambas (Koetz y Kosmella, 2007). Dependiendo del grupo funcional, se conocen como polielectrolitos fuertes o débiles. Esta última característica se refiere a que la densidad de carga de los PE con grupos funcionales fuertes (eje: $-SO_4^{2-}$) no depende de las condiciones del medio líquido y lo contrario ocurre con los PE con grupos funcionales débiles

(eje: $-\text{COO}^-$, $-\text{NH}_3^+$), para los cuales la densidad de carga depende del pH y en menor medida de la fuerza iónica.

Clasificación de los PE

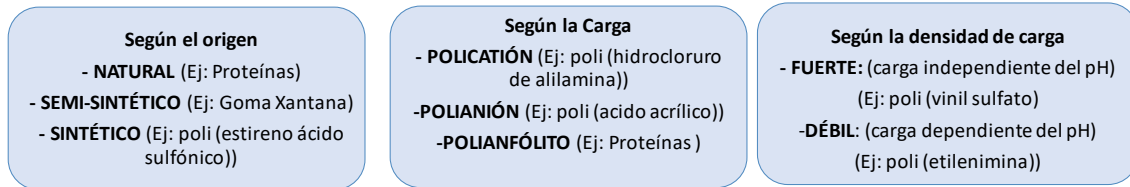


Figura 2.9. Clasificación de los Polielectrolitos.

2.2.2. Grado de ionización de un polielectrolito

El grado de ionización de un polielectrolito débil está influenciado por el pH de la solución, pero además por el contenido de sal o por la presencia de otras entidades cargadas (Rathee y col. 2018).

En el rango de pH donde el PE se encuentra ionizado, se producen repulsiones intra e intermoleculares que mantienen al mismo en una conformación extendida, y, por lo tanto, soluble en agua. Por otro lado, en el rango de pH en el cual el PE se encuentra sin cargas, las cadenas del PE pueden interactuar entre ellas y llegar a formar agregados insolubles.

Por otro lado, cuando aumenta la fuerza iónica del medio por agregado de un electrolito (sal), tanto los polielectrolitos débiles como fuertes, se vuelven más flexibles. (Wågberg y col 2002). Esto se debe a que las cargas comienzan a “apantallarse” (*screening*), generando menos repulsión. Si la fuerza iónica del medio es muy alta (ej.: concentración de NaCl mayor a 0,1N), los polielectrolitos débiles, pueden adquirir una estructura marcadamente enrollada (**Figura 2.10**).

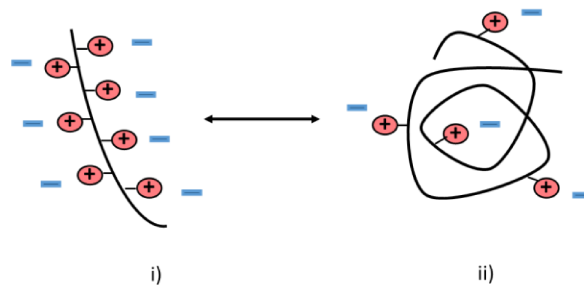


Figura 2.10. Representación de los casos extremos de las conformaciones que adquiere un polielectrolito de alta o baja densidad de carga en un medio de baja fuerza iónica (I) y un polielectrolito de baja o media densidad de carga en un medio con alta fuerza iónica (II).

Particularmente, Lee y col. (2011) demostraron mediante titulaciones potenciométricas que la presencia de NaCl debilita la repulsión electrostática entre los grupos aminos presentes en una cadena de una poliamina, (poli-(2-dimetilaminoetil metacrilato)) (PDMAEMA), y estabiliza la forma protonada de la misma. Por lo tanto, a un determinado valor de pH, el grado de ionización de la cadena aumenta, siendo este efecto bastante significativo a una concentración de 150 mM NaCl (**Figura 2.11**). En otras palabras, el pKa de la poliamina se modifica por la presencia de sales hacia valores mayores de pH. La figura también muestra que, a un determinado pH, el grado de ionización de la poliamina (que es catiónica) aumenta aún más por la presencia de un polielectrolito de carga opuesta, el poli (4-estireno sulfonato de sodio) (PSS) que estabiliza la forma protonada de los grupos amina.

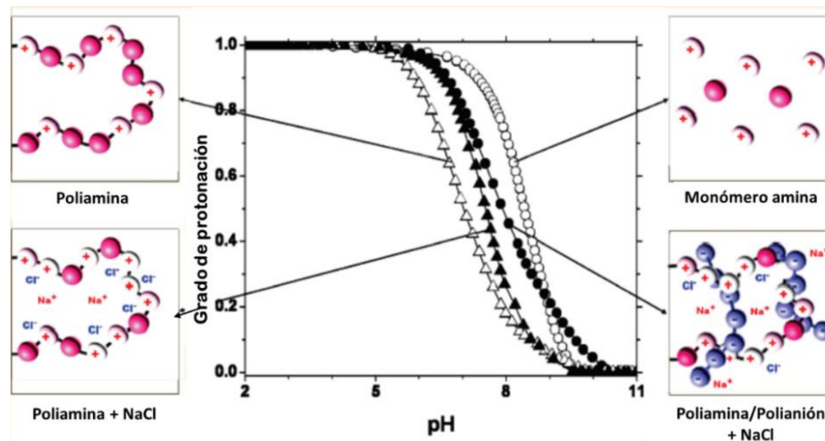


Figura 2.11. Efecto de la presencia de NaCl y de un polianión, el poli (4-estireno sulfonato de sodio) (PSS), en el grado de ionización de una poliamina (poli-(2-dimetilaminoetil metacrilato))(PDMAEMA) (Extraído de Lee y col. 2011).

Choi y Rubner (2005) aplicaron la técnica de adsorción de sucesivas capas de PEs de carga opuesta y mostraron que el grado de ionización de un PE débil es fuertemente incrementado frente a un PE de carga opuesta. Determinaron, a diferentes valores de pH, el grado de ionización del poli (ácido acrílico) (PAA) en su estado en solución puro y cuando éste se ensambló en una película multicapa junto a otro polímero de carga opuesta como: a) el poli (cloruro de alilamina) (PAH), b) el poli (cloruro de dialildimetilamonio) (pDADMAC) y c) el poli (cloruro de 4-vinilbencil trimetilamonio) (PVTAC). Cuantificaron el grado de ionización por análisis de espectroscopia infrarroja de las películas. En la **Figura 2.12** se evidencia claramente el cambio en el grado de ionización del PAA cuando éste se encuentra formando una multicapa con un polímero de carga opuesta. En todos los casos se observó un cambio del pKa del PAA, mostrando un mayor grado de ionización para un dado pH.

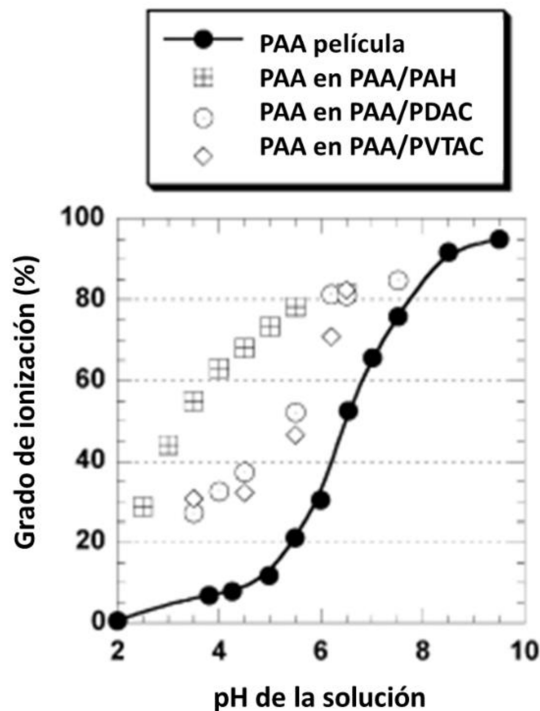


Figura 2.12. Grado de ionización estimado del PAA en las películas multicapas de PAA / PAH poli (cloruro de alilamina), PAA / PDAC poli (cloruro de dialildimetilamonio), y PAA / PVTAC poli (cloruro de 4-vinilbencil trimetilamonio) en función del pH (Extraído de Choi y Rubner, 2005).

2.2.3. Métodos de caracterización de los polielectrolitos

Los polielectrolitos exhiben fenómenos interesantes debido a su doble carácter de macromolécula y de electrolito. Por lo tanto, se deben caracterizar con respecto a sus propiedades macromoleculares y con respecto a sus propiedades electroquímicas (Koetz y Kosmella, 2007).

Los métodos utilizados para la caracterización de los parámetros macromoleculares de los polímeros neutros (sin grupos ionizables) en solución también pueden ser utilizados para caracterizar a los polielectrolitos. Por lo tanto, el peso molecular promedio y la distribución del peso molecular de los polielectrolitos se puede determinar por cromatografía líquida de exclusión de tamaño (SEC). Otros métodos que se pueden utilizar son medidas viscosimétricas para determinar el peso molecular viscosimétrico y dispersión dinámica de luz (DLS) para obtener el peso molecular másico, entre otras.

Las características electroquímicas de los polielectrolitos se pueden determinar por titulaciones potenciométricas y, además por titulaciones polielectrolíticas utilizando medidas de potencial por flujo de cargas para detectar el punto final de la titulación. A continuación, se describen brevemente estas dos últimas técnicas que se utilizan a lo largo de la Tesis.

-Titulaciones potenciométricas

Las titulaciones potenciométricas permiten determinar de una manera simple el grado de sustitución de los PE, es decir, la cantidad de grupos funcionales presentes en el mismo. Para estas determinaciones, los polianiones llevados a su forma ácida se titulan con hidróxido de sodio u otra base, y las polibases, llevadas a su forma alcalina se titulan con un ácido como el HCl. En contraste con las titulaciones ácido/base de las moléculas de bajo peso molecular, el punto de equivalencia es menos pronunciado y por lo tanto su determinación es más dificultosa.

Además, esta técnica es muy utilizada para la determinación de la constante de acidez pK_a (o basicidad pK_b) de un PE. La constante de acidez de un PE, suele ser diferente que las

correspondientes a los ácidos de menor peso molecular que presentan menor tendencia a ionizarse. Por ejemplo, la constante de acidez del ácido acético es de $pK_a = 4,75$, mientras que la del poli (ácido acrílico) es de $pK_a = 4,58$. Esta diferencia puede ser afectada por la presencia de sustituyentes, de grupos hidrofóbicos y por los efectos conformacionales de los PE (Koetz y Kosmella, 2007).

-Titulaciones polielectrolíticas

La titulación polielectrolítica consiste en titular con una solución estándar de un polielectrolito de alta densidad de carga, fuerte y lineal, una solución de un polielectrolito de carga opuesta, también de alta densidad de carga y fuerte.

El método se basa en que la formación del complejo entre los dos polielectrolitos de alta densidad de carga y opuesta, es generalmente estequiométrica (1:1). Para detectar el punto final de la titulación, se puede utilizar medidas de potencial de flujo de cargas (PFC) utilizando un equipo BTG Mütec® (el más conocido) o Chemtrac®. En el capítulo 3 se describe con más detalle el principio de funcionamiento de este último equipo mencionado.

Para determinar la concentración de polielectrolitos catiónicos se utilizan como titulantes soluciones estándar de polielectrolitos aniónicos lineales, de alta densidad de carga y fuertes como el polivinilsulfato de potasio (PVSK) o el polietilensulfonato de sodio (PESNa). Por el contrario, cuando se desea determinar la concentración de polielectrolitos aniónicos se utilizan polielectrolitos catiónicos lineales, de alta densidad de carga y fuertes como el cloruro de poli (dialildimetilamonio) (pDADMAC), previamente normalizados con solución estándar (PVSK o PESNa).

En la **Figura 2.13** se muestra una curva de titulación obtenida al titular un polielectrolito lineal y de alta densidad de carga, el pDADMAC, con otro polímero lineal y fuerte como el PVSK. Se puede observar que la titulación presenta estequiometría 1:1.

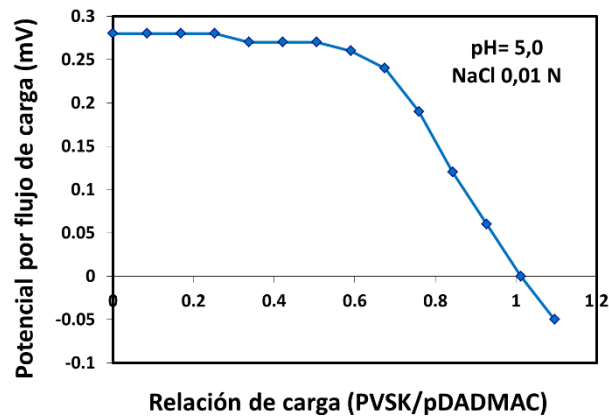


Figura 2.13. Curvas de titulación de una solución de pDADMAC a pH 5,0 y fuerza iónica 10 mM NaCl, utilizando medidas de potencial por flujo de cargas (mV). Titulante utilizado: solución de poli (vinil sulfato) de potasio, PVSK (200 μ N). El punto de equivalencia se relaciona con la medida de potencial de 0 mV.

Otra característica que puede afectar a la estequiometría de las titulaciones, es la distancia promedio entre dos grupos iónicos adyacentes en la misma molécula del PE. Se ha informado que la similitud en la separación entre los iones de cada PE que interacciona, es esencial para la estequiometría de la reacción (Chen y col. 2003). Además, estos últimos autores han observado desviaciones de la estequiometría 1:1 hacia valores mayores, al aumentar la concentración de sales en el medio líquido (**Figura 2.14**) cuando se titula una solución de pDADMAC con una solución estándar de PVSK.

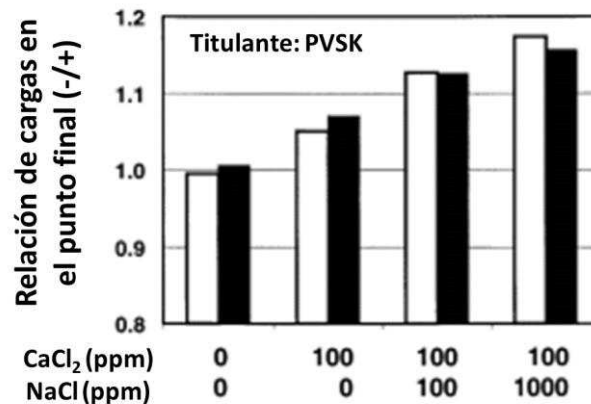


Figura 2.14. Relación de cargas en el punto final de las pruebas de medidas de potencial por flujo de cargas al añadir PVSK (titulante) a soluciones diluidas de pDADMAC y utilizando diferentes concentraciones de NaCl y CaCl₂. Las barras rellenas corresponden a pruebas replicadas (Extraído de Chen y col. 2003).

Por otro lado, Chen y col. (2003) utilizando polielectrolitos fuertes, lineales y de alto peso molecular, mostraron que el punto final de la titulación también depende del orden de adición de los polielectrolitos utilizados.

2.3. COMPLEJOS DE POLIELECTROLITOS (PECs)

Se denomina complejos de polielectrolitos (PECs) a la combinación de dos polielectrolitos de carga opuesta (**Figura 2.15**). La formación de estos complejos permite explotar las ventajas individuales de los polielectrolitos y la creación de una nueva unidad nanoestructurada (Ankerfors y Wågberg, 2014) con propiedades diferentes a los polímeros de partida.

La fuerza impulsora para la asociación entre los PEs se ha descrito en términos de: las interacciones eléctricas (interacciones coulombianas) entre los polielectrolitos de carga opuesta y la ganancia de entropía causada por la liberación de contraiones (Chen y col. 2003; Koetz y Kosmella, 2007; Ankerfors 2008). Además, se pueden presentar interacciones intermacromoleculares del tipo puente de hidrógeno, van der Waals, dipolo-dipolo y efectos hidrofóbicos (Koetz y Kosmella, 2007).

Kabanov y Zezin (1984) investigaron por primera vez la cinética de formación de complejos y han demostrado que este proceso se lleva a cabo en menos de 5 *ms*, incluso a muy altas diluciones. Sin embargo, estos complejos, una vez formados, pueden sufrir reacomodamientos (Koetz y Kosmella, 2007).

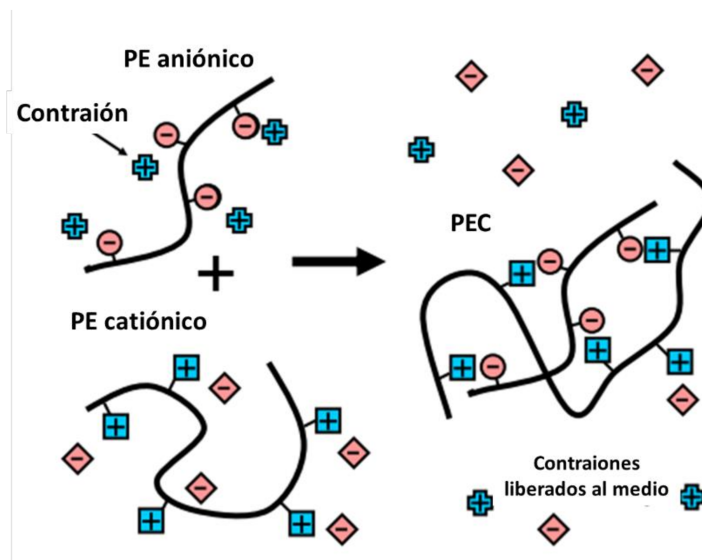


Figura 2.15. Representación esquemática de la formación de complejo de polielectrolito (PEC) por la interacción de dos polielectrolitos (PE) de carga opuesta (Extraído de Hubbe y col. 2013).

Según las condiciones del medio, la formación de los PECs puede dar como resultado la formación de una nanodispersión ópticamente homogénea y estable con dimensiones en un rango de tamaño coloidal (Mao y col. 2006).

La suspensión de complejos tendrá naturalmente una menor viscosidad que las soluciones de polímeros correspondientes en similar concentración. La viscosidad generalmente disminuye por la drástica reducción del volumen hidrodinámico total de los dos polielectrolitos a través de la complejación y la formación de complejos compactos. Pero en el caso de la formación de complejos expandidos tipo gel, la viscosidad puede aumentar (Lee y col. 1997).

2.3.1. Mecanismos de formación de PECs

Los PECs pueden adoptar diferentes estructuras dependiendo del pH y la concentración de sal del medio, la concentración de los polímeros y la velocidad de mezclado. Cuando se hace un agregado gradual de un polielectrolito sobre otro, el orden de ese agregado tiene también su efecto. De acuerdo con las características estructurales de los polielectrolitos simples utilizados,

existen dos modelos (Michaels y Miekka, 1961) acerca de la conformación que adquieren cuando se los combinan agregando cantidades estequiométricas (**Figura 2.16**):

a) el modelo de escalera (*ladder model*) que asume que los dos polielectrolitos tienen suficiente flexibilidad y una densidad de carga aceptable para que puedan unirse en forma cooperativa. Esto puede ocurrir cuando se mezcla un polielectrolito “anfitrión” con un polielectrolito “invitado” de masa molecular mucho menor. Esto está favorecido, además, por concentraciones bajas y por el agregado gradual de la solución del polímero de menor masa molar.

b) el modelo de huevos revueltos (*scrambled egg*) que se forma cuando se mezclan dos polielectrolitos de alta masa molecular y densidad de carga similar.



a) Modelo de escalera b) Modelo de huevo revuelto

Figura 2.16. Diferentes modelos de formación de complejos de polielectrolitos (Extraído de Koetz y Kosmella, 2007).

Por otro lado, se pueden formar tres tipos de complejos a medida que se va agregando un polielectrolito sobre el otro:

1) Solubles: cuando uno de los polielectrolitos actúa como anfitrión del otro de masa molecular marcadamente menor gradualmente agregado, y se mantiene así hasta un valor crítico entre las concentraciones de ambos polielectrolitos a partir del cual coexisten PECs solubles y coloidales.

2) Coloidales: donde ocurre separación de fase microscópica que se refleja en la turbidez del medio y puede conducir a la formación de agregados de complejo de mayores dimensiones.

3) Coacervado: donde ocurre separación macroscópica de fase. Se forma una fase densa o precipitado hidratado (“gotas” de coacervado que tienen apariencia líquida) conteniendo la mayoría de las macromoléculas complejadas (Spruijt 2012).

Por lo tanto, desde el punto de vista químico, el proceso de formación de los PECs es bastante simple, no obstante, se deben tener en cuenta todas las variables planteadas anteriormente cuando se seleccionan los polielectrolitos simples a estudiar y las condiciones del medio de formación de los PECs.

Schatz y col. (2004), estudiaron la formación de PECs entre dos polisacáridos, quitosano (+) / sulfato de dextrano (-). En la **Figura 2.17** se muestra el mecanismo de formación planteado por los autores cuando se adicionó lentamente solución de sulfato de dextrano de bajo peso molecular y alta densidad de carga a una solución de quitosano de alto peso molecular.

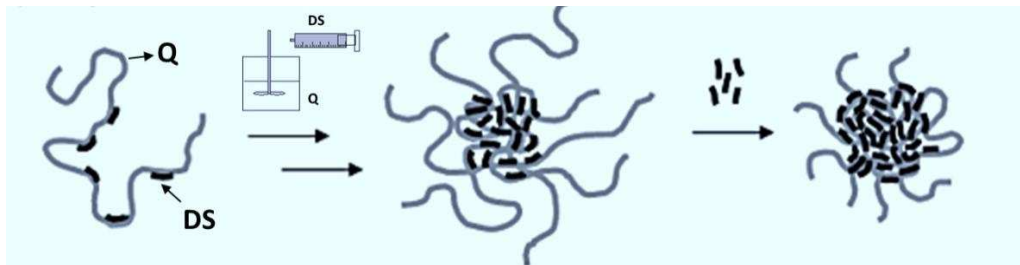


Figura 2.17. Formación de los complejos de polielectrolitos por adición gradual del sulfato de dextrano de bajo peso molecular a la solución de quitosano de alto peso molecular (Extraído de Schatz y col. 2004).

El proceso de formación de partículas se basa en la formación de segmentos hidrófobos en las cadenas de polímeros mediante la neutralización de la carga. Estos segmentos interactúan entre sí formando partículas que se encuentran estabilizadas por las cargas catiónicas libres de las cadenas de quitosano. Estas cadenas son hidrofílicas y constituyen la “corona” de las partículas, las cuales pueden seguir interactuando con el polielectrolito de carga opuesta hasta alcanzar la neutralidad. No obstante, estos autores también plantearon que, debido a la conformación relativamente rígida que adquieren las cadenas de quitosano al inicio de la formación de los segmentos hidrófobos, se puede formar un corazón hinchado (*swelled*). Este

hinchamiento se debe a las cargas libres catiónicas del quitosano que quedan dentro de la partícula.

Podemos pensar aquí que, estas cargas catiónicas se volverán así inaccesibles al polielectrolito negativo conduciendo a desviaciones de la estequiometría entre los polielectrolitos. Finalmente, en el punto de neutralidad superficial de carga, los complejos presentan una floculación que no se revierte por la adición de un exceso de cargas. Esto puede deberse probablemente a la habilidad de los polisacáridos de asociarse mediante numerosos puentes de hidrógeno (Schatz y col. 2004).

El cambio en el orden de agregado de los polielectrolitos puede conducir a la formación de complejos de polielectrolitos con distinta conformación. Schatz y col. (2004) también estudiaron el mecanismo de formación de PECs agregando gradualmente quitosano (+) de alto peso molecular y alta densidad de carga sobre una solución de sulfato de dextrano (-) de bajo peso molecular y alta densidad de carga (**Figura 2.18**). En este caso, ya se observa al inicio de la adición una pobre estabilidad coloidal y floculación. El sulfato de dextrano con una conformación flexible y en exceso neutraliza las cargas del quitosano con facilidad, dando lugar rápidamente a una partícula casi neutra, desfavoreciendo la estabilidad.

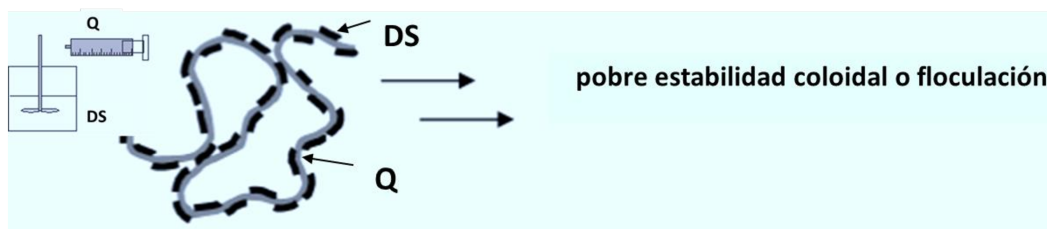


Figura 2.18. Formación de los complejos de polielectrolitos por adición gradual del quitosano de alto peso molecular a la solución de sulfato de dextrano de bajo peso molecular (Extraído de Schatz y col. 2004).

En este trabajo de Tesis se obtuvieron complejos de polielectrolitos entre dos polisacáridos, xilano y quitosano. Ambos son polielectrolitos débiles, naturales y presentan una masa molecular marcadamente diferente. Por lo tanto, el fenómeno descrito anteriormente para la asociación de las cadenas de quitosano y sulfato de dextrano puede ser válido para nuestro sistema.

2.3.2. Métodos de caracterización de los complejos de polielectrolitos

Para la caracterización de los complejos de polielectrolitos también se utilizan técnicas que permitan estudiar su comportamiento electroquímico y técnicas que permitan realizar un análisis morfológico de las partículas formadas. A continuación, se detallan algunas de las técnicas más utilizadas.

- Monitoreo de la formación gradual de los complejos de polielectrolitos

- A través de medidas de potencial por flujo de cargas

La determinación de cargas en un sistema utilizando medidas de potencial por flujo de cargas, ya mencionada para la titulación de los polielectrolitos, permite hacer un seguimiento directo a medida que los complejos se forman. La **Figura 2.19** muestra el seguimiento de la formación de complejos de poli (alilamina de clorhidrato) (PAH) / xilano a dos fuerzas iónicas distintas. En la figura se puede observar además claramente las desviaciones a la estequiometría al aumentar la fuerza iónica del medio líquido. El grupo de trabajo ha encontrado que una misma tendencia, y un similar punto de neutralidad pueden encontrarse si la formación se sigue por medio de mediciones del potencial zeta del sistema (Galván y col. 2015).

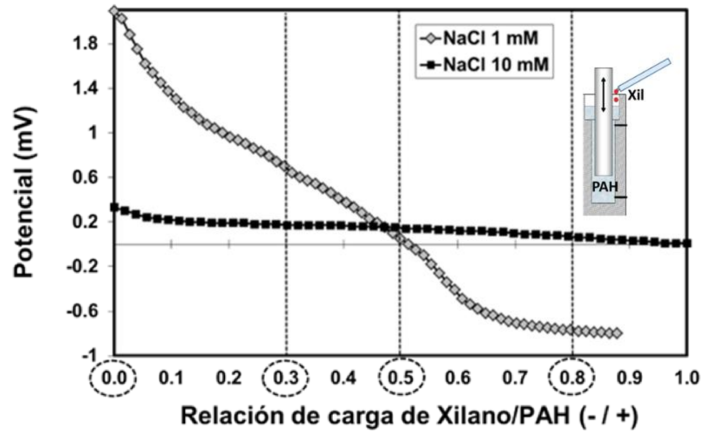


Figura 2.19. Efecto de la adición de una solución de xilano sobre una solución de PAH en las medidas de potencial de flujo de cargas (mV), a diferentes fuerzas iónicas (1 mM y 10 mM de NaCl) y pH 7,5 (Galván y col. 2015).

- A través de medidas de turbidez

A partir de los máximos de turbidez generalmente puede determinarse la relación de masa o de carga entre los PE en el punto de neutralización de cargas cuando se agrega gradualmente la solución de un PE sobre la solución de otro. La turbidez además permite tener una primera aproximación acerca de la estabilidad y del tamaño de los PECs formados. En la **Figura 2.20** se muestran los diferentes tipos principales de curvas de titulaciones turbidimétricas que se pueden presentar durante la formación de los PECs (Koetz y Kosmella, 2007). En el primer caso se puede observar un incremento en los valores de turbidez cerca del punto de floculación seguido de una separación de fase por formación de agregados en el punto final de la titulación. En el segundo caso, un incremento gradual de la turbidez ocurre hasta alcanzar una meseta indicando la formación de complejos estables. Y en el último caso, el máximo de turbidez coincide con el punto de neutralización de cargas, seguido de una redispersión de los agregados por exceso de cargas libres.

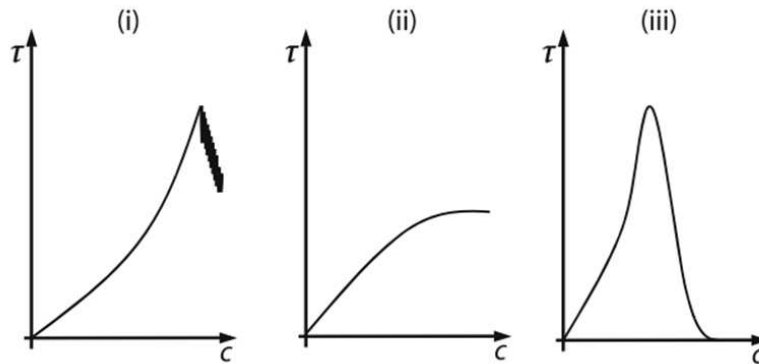


Figura 2.20. Diferentes curvas de titulaciones turbidimétricas: i) aumento pronunciado cerca del punto de floculación con posterior separación de fase en el punto final de la titulación; ii) aumento gradual de la turbidez hasta un valor constante, indicando una dispersión estable; iii) curva en forma de campana con presencia de una redispersión de los agregados formados luego del punto máximo de turbidez (Extraído de Koetz y Kosmella, 2007).

- Determinación de la densidad de carga

Si bien hasta el momento no hemos encontrado referencias al respecto, la titulación polielectrolítica también se puede utilizar para determinar la densidad de carga de los complejos de polielectrolitos formados a una determinada relación de masa y bajo determinadas condiciones. Se utiliza para ello un polielectrolito fuerte de alta densidad de carga para minimizar desviaciones de la estequiometría en la neutralización coloidal del complejo. El punto de equivalencia obtenido puede no coincidir con el punto de equivalencia teórico que puede calcularse a partir de la carga de los tres polielectrolitos individuales (dos PE que forman el complejo original y el polielectrolito de titulación). Como se explicó en el punto 2.2.3 estas desviaciones ocurren debido a que no todas las cargas del complejo a titular se encuentran accesibles para la neutralización coloidal producida en la titulación. La presencia de altas concentraciones de sales permitirá una estructura más enrollada del complejo original y así se puede incrementar la desviación estequiométrica.


- Otras técnicas

Otras técnicas clásicas de caracterización de partículas que fueron utilizadas en esta Tesis para caracterizar los complejos de polielectrolitos son: determinación del potencial zeta, tamaño de partícula, y estabilidad coloidal, que se detallan luego en el **capítulo 3, Parte B**.



CAPÍTULO 3

PARTE A: CARACTERIZACIÓN DE
LOS POLIELECTROLITOS XILANO Y
QUITOSANO



En la Parte A de este capítulo se muestran los resultados obtenidos de la caracterización de los polielectrolitos naturales utilizados: el xilano (Xil) y el quitosano (Q).

En la Parte B se muestran los resultados de la evaluación del efecto de la fuerza iónica, el orden de agregado de los polielectrolitos, el pH en la formación y en las características de los complejos de polielectrolitos de Xil y Q. Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionan las relaciones de masa de Xil y de Q para preparar complejos de polielectrolitos catiónicos (CatPECs) y aniónicos (AnPECs) con el 30% de cargas neutralizadas. Los PECs se caracterizan a través de determinaciones de densidad de carga, potencial zeta, tamaño de partícula y se analiza la estabilidad coloidal.

3.1. MATERIALES

- Xilano

El xilano (Xil) utilizado fue el 4-O-metilglucuronoxilano aislado de madera de haya (*beechnwood*, latifoliada) por extracción alcalina y suministrado por Sigma-Aldrich (número de producto: X-4252).

El peso molecular medio fue determinado por cromatografía de exclusión por tamaño y utilizando un detector de índice de refracción, resultó ser **M_w : 18,7 Kg/mol, M_w/M_n : 1,8**. Se utilizó NaOH 0,1 M como eluyente y como estándares poli (sulfonato de estireno) (PSS) de distintos pesos moleculares. El mismo fue determinado por técnicos especialistas de la Universidad de Aalto (Otaniemi, Finlandia).

- Quitosano

El quitosano (Q) fue suministrado por Sigma-Aldrich. El peso molecular viscosimétrico del mismo, fue determinado por personal del grupo de polímeros del INTEC (Santa Fe), utilizando un equipo de medición automático de viscosidad (Schoot Gerate AVS 300), equipado con un viscosímetro capilar Cannon-Fenske N° 75, dentro de un baño termostatzado a 25 °C. El valor promedio de siete réplicas del peso molecular viscosimétrico del Q resultó de **M_v : 189,8 Kg/mol**.

-Otros polielectrolitos

- Poli (dimetildialilamonio) (pDADMAC), con una masa molecular media M_w : 400-500Kg/mol y suministrado por Sigma-Aldrich como una solución al 20% (p/p).
- Poli (vinilsulfato de potasio) (PVSK), con una masa molecular media M_w : 170 Kg/mol y suministrado por AppChem (Inglaterra) como una solución estándar de 1000 μ N.

-Sustancias patrones

- L- Fucosa, suministrado por Sigma-Aldrich, "ultra" > 99% de pureza.
- D- Xilosa, suministrado por Sigma-Aldrich "ultra" > 99% de pureza.
- Ácido D-galacturónico, suministrado por Sigma-Aldrich > 98% de pureza.

3.2. MÉTODOS PARA CARACTERIZAR LOS POLIELECTROLITOS

3.2.1. Caracterización del xilano

Las soluciones de Xil se prepararon diariamente a una concentración de 2,5 g xilano/L disolviéndolo en una solución de NaOH 10^{-4} N y 0,01 N NaCl. Luego, las soluciones se calentaron a baño María a 95 °C durante 15 min, de acuerdo con lo detallado por Linder y col. (2003).

3.2.1.1. Determinación de la pureza

Para la determinación de la pureza del xilano comercial se determinó el contenido de xilosa obtenido por hidrólisis ácida del xilano y cuantificación por cromatografía iónica (HPAEC-PAD) y, además, se determinó el contenido de grupos ácidos 4-O-metilglucurónicos presentes en el polímero utilizando el método de Scott (1979).

a) Determinación del contenido de xilosa mediante cromatografía iónica (HPAEC-PAD)

Se determinó el contenido de xilosa presente en el xilano utilizando cromatografía de intercambio aniónico con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD, equipo Waters® disponible en el INTEC-CONICET, Santa Fe). La columna y guardacolumna empleadas fueron CarboPAC PA1 (Dionex). Esta técnica es selectiva y específica para determinar

carbohidratos. Su fundamento de separación es el diferente grado de ionización de los azúcares en medio alcalino. La detección de pulso amperométrico solo detecta compuestos que tienen grupos funcionales capaces de ser oxidados al voltaje de selección empleado, siendo para este caso, la sensibilidad de los carbohidratos de varios órdenes de magnitud mayor que el de otros analitos.

Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron: 16 mM NaOH a un flujo de 1,0 mL/min y temperatura de columna 40 °C. Las condiciones del detector utilizadas se detallan en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Condiciones seleccionadas en el detector amperométrico.

Temperatura(°C)	E ₁ (V)	E ₂ (V)	E ₃ (V)	t ₁ (ms)	t ₂ (ms)	t ₃ (ms)	t _s (ms)
45	0,15	0,75	-0,8	300	150	150	100

Modo: pulso Rango: 50 µA. Filtro: 0,1 s.

Las muestras a inyectar en el cromatógrafo se prepararon siguiendo la metodología propuesta por Sluiter y col. (2011). Ésta se basa en una hidrólisis ácida de la muestra de xilano comercial en medio ácido sulfúrico al 72% (p/p) por 1h, seguido de dilución hasta una concentración de 4 % (p/p) y autoclave a 121 °C (1520 mmHg) durante 1 hora más. Las muestras hidrolizadas se neutralizaron con hidróxido de bario y utilizando indicador azul de bromo fenol (se consideró el sobrenadante). Para corregir las pérdidas debido a la destrucción de los azúcares (monómeros) durante la hidrólisis ácida, se realizó el mismo procedimiento a una muestra de xilosa estándar (D-xilosa (Sigma-Aldrich)).

Para la curva de calibrado se utilizaron soluciones estándares de D-xilosa (Sigma Aldrich "ultra" > 99% de pureza) y de L-fucosa (Sigma Aldrich "ultra" > 99% de pureza) como estándar interno.

b) Determinación del contenido de grupos ácidos 4-O-metilglucurónicos por método de Scott.

El método de Scott (1979) consiste en una hidrólisis ácida del xilano con ácido sulfúrico concentrado, seguido de una reacción colorimétrica. En un tubo de ensayo se

agregaron 0,125 mL de la muestra de xilano a una concentración de 0,43 mg/mL ($\approx 50 \mu\text{g/mL}$ de anhídrido urónico) y 0,125 mL de 2% NaCl. Luego de mezclar, se adicionaron 2 mL de H_2SO_4 comercial (96%) e inmediatamente se volvió a mezclar. Se colocaron los tubos en un baño a 70 °C durante 10 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente en un baño de agua durante 20-30 s. En estas condiciones se obtiene el cromógeno 5-formil-2-furancarboxílico que reacciona selectivamente con 0,1 mL del reactivo colorimétrico selectivo 3,5-dimetilfenol (0,1g en 100 mL de HAc). Por último, en un espectrofotómetro (CECIL 3055) se midió la diferencia de los valores de absorbancia a 450 y a 400 nm (10-15min después de haber agregado el reactivo colorimétrico). El blanco se realizó siguiendo el mismo procedimiento, pero sin la muestra. Como estándar, para realizar la curva de calibrado, se utilizó el ácido D-galacturónico (Sigma Aldrich).

c) Determinación de lignina soluble e insoluble y cenizas

Se utilizó para estas determinaciones el material obtenido de la hidrólisis ácida detallada en el ítem a) de esta sección y siguiendo la metodología propuesta por Sluiter y col. (2011). El residuo sólido (lignina insoluble) se obtuvo por filtración a través de membrana de fibra de vidrio de peso conocido y de 0,45 μm de tamaño de poro, seguido de lavado con 50 mL de agua deionizada y secado en estufa a 105 °C ± 3 °C hasta pesada constante. La determinación de lignina soluble se realizó por mediciones de absorbancia de la solución filtrada en un espectrofotómetro (CECIL 3055) a 240 nm. Se utilizó ácido sulfúrico al 4% (p/p) como blanco. Finalmente, considerando la absorptividad de lignina $a_\lambda = 25 \text{ L g}^{-1}\text{cm}^{-1}$ se determinó la concentración de lignina soluble (Sluiter y col. 2011).

Cálculos utilizados para determinar el contenido de lignina insoluble + cenizas en ácido (LIA) y de lignina soluble en ácido (LSA):

$$\text{LIA (\%)} = \frac{\text{masa de residuo sólido} \cdot 100}{\text{masa seca de xilano}} \quad \text{Ec. (3.1)}$$

$$\text{LSA (\%)} = \frac{\text{Absorbancia} \cdot \text{Volumen filtrado} \cdot \text{dilución} \cdot 100}{\text{Absortividad} \cdot \text{masa}_{\text{seca xilano}} \cdot \text{long.camino óptico}} \quad \text{Ec. (3.2)}$$

3.2.1.2. Determinación de la densidad de carga

a) Titulación conductimétrica

La titulación conductimétrica se realizó siguiendo el método propuesto por Lloyd y Horne (1993), adaptado para analizar xilano en solución. Estos autores propusieron inicialmente este método para cuantificar el contenido de grupos ácidos totales en pulpas químicas.

Para determinar el contenido de grupos ácidos del xilano, en un vaso cerrado se agregaron 50 mL de solución de xilano (0,66 g/L) y se agregó una cantidad de HCl en exceso hasta alcanzar un valor inicial de pH 2,0 (1,2 mL HCl 0,1N) necesario para asegurar que todos los grupos ácidos carboxílicos del xilano se encuentren en su forma no ionizada y 0,3 mL de NaCl 1 N. La titulación se realizó utilizando NaHCO_3 0,01 M como titulante, con agitación continua y en atmósfera de nitrógeno (**Figura 3.1**). Se tomaron medidas de conductividad (termo/conductímetro marca INOLAB) cada 0,2 mL de titulante adicionado, utilizando una microbureta.

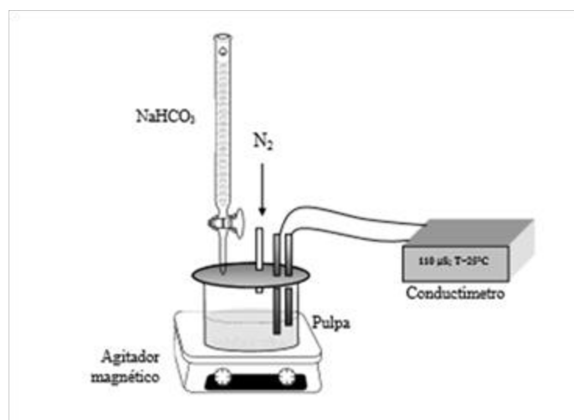


Figura 3.1. Dispositivo utilizado para la titulación conductimétrica. La solución de Xil se agita continuamente y se agrega cada 5 min 0,2 mL del titulante previa lectura de conductividad.

Durante la titulación, al adicionar los primeros mL del titulante, la conductividad detectada disminuye por la neutralización del HCl adicionado en exceso, seguidamente se presenta una meseta indicando la titulación de los grupos ácidos del Xil (**Figura 3.2**). La tendencia a una meseta en los valores de conductividad en esta región responde a que, al agregar el titulante, ambos fenómenos: a) intercambio de protones por el catión sodio en los

grupos carboxilos del xilano y b) la neutralización de este protón con el titulante, no modifican significativamente la conductividad. Por último, los valores de conductividad aumentan por el exceso del titulante adicionado.

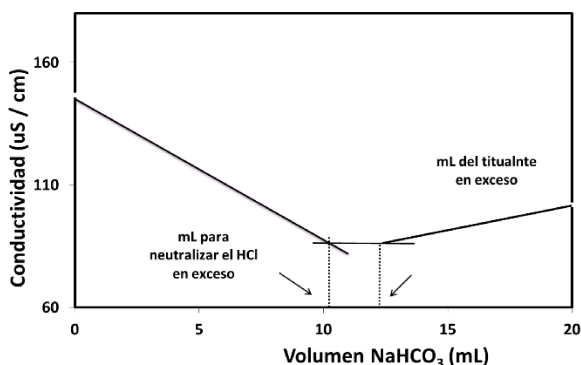


Figura 3.2. Curva de titulación conductimétrica típica. El punto de intersección entre las líneas de la meseta y la determinada por los mL en exceso corresponde a los mL de titulante utilizados para neutralizar los grupos ácidos de la pulpa.

La densidad de carga se determinó utilizando la siguiente **ecuación 3.3**:

$$\rho_{xilano} = \frac{N_{NaHCO_3} \cdot V_{NaHCO_3}}{C_{xilano} \cdot V_{xilano} \cdot S_{xilano} \cdot P_{xilano}} = \text{meq/g}_{xilano} \quad \text{Ec. (3.3)}$$

Donde:

N_{NaHCO_3} : Normalidad de $NaHCO_3$ (meq/mL).

V_{NaHCO_3} : Volumen de $NaHCO_3$ gastado para neutralizar todos los grupos ácidos del Xil (mL).

C_{xilano} : Concentración de xilano (g/L).

V_{xilano} : Volumen de xilano (L).

S_{xilano} : Sequedad del xilano ($g_{secos}/g_{humedos}$).

P_{xilano} : Pureza del xilano ($g_{puros}/g_{impuros}$).

b) Titulación polielectrolítica directa

La densidad de carga de la solución del xilano se determinó por titulación polielectrolítica sugerida por Terayama (1952) pero utilizando medidas de potencial por flujo de cargas para detectar el punto final de la titulación cuando el potencial medido en el equipo es 0 mV. El equipo utilizado fue Chemtrac Modelo CCA 3100: potencial de corriente de flujo (PCF) (**Figura 3.3**).

El principal elemento del equipo es un recipiente de teflón cilíndrico dentro del cual se desplaza un pistón con movimiento vertical oscilante a frecuencia constante (**Figura 3.4**). Como el espacio entre el pistón y el cilindro es pequeño (2 mm) comparado con el diámetro

del pistón (12 mm), el movimiento del pistón provoca un rápido movimiento del fluido hacia arriba y abajo dentro del anillo.

El flujo dentro del vaso causa que la nube difusa de los contraiones sea desplazada de los transportadores de carga (partículas coloidales o polímeros) induciendo así un potencial entre los electrodos. Dos electrodos internos a diferentes alturas sirven para medir ese potencial por flujo de cargas.

Para esta determinación, se utilizó como titulante un polielectrolito catiónico y fuerte, el cloruro de poli (dimetildialilamonio) (pDADMAC). Se preparó una solución de 235 μN de pDADMAC y se normalizó con solución estándar de poli (vinilsulfato de potasio) (PVSK) de 200 μN preparado a partir de la solución estándar 1000 μN .

Para todos los casos el titulante (pDADMAC) se acondicionó al pH y fuerza iónica de la determinación. En un vaso de precipitado se colocaron 7 mL de solución de Xil (2,5g/L) y se llevó a 150 mL (0,5 g/L) con solución de NaCl y por último se acondicionó al pH de estudio. A medida que se agrega el titulante a la solución de xilano que se encuentra bajo agitación, las cargas aniónicas del xilano se van anulando y el potencial medido se reduce. Una lectura de CERO en el equipo indica que se ha alcanzado el punto final de la titulación y es un indicativo de que se neutralizó cualquier exceso de carga que existe en la superficie de las partículas.



Figura 3.3. Equipo Chemtrac Modelo CCA 3100 utilizado para titulación con medidas de potencial por flujo de cargas (PFC).

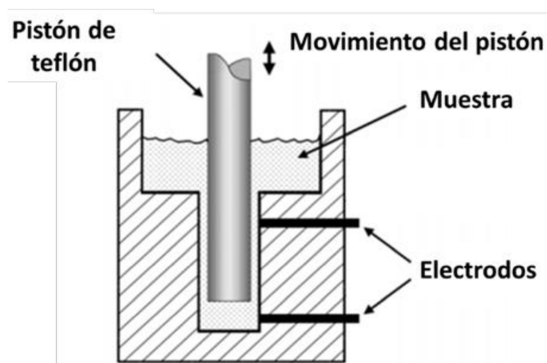


Figura 3.4. Esquema de un detector de potencial por flujo de cargas (Extraído de Hubbe y Chen 2004).

3.2.2. Caracterización del quitosano

Las soluciones se prepararon de acuerdo a lo reportado por Rinaudo y col. (1999), disolviendo el sólido a una concentración de 1,0 g/L en una solución de ácido acético de concentración 1,0% (p/v). Luego, la solución fue colocada en un baño ultrasónico durante 10 minutos y se agitó con agitador magnético durante 30 minutos. Se filtró utilizando una membrana de fibra de vidrio (de peso conocido) de 0,22 μm tamaño de poro. Finalmente, la membrana se secó en estufa a 105 °C y la cantidad de Q retenida en el filtro fue pesada para calcular la concentración final exacta de la solución.

3.2.2.1. Determinación de la densidad de carga

a) Titulación potenciométrica

Se realizó la titulación potenciométrica propuesta por Jiang y col. (2003), la cual consiste en disolver el Q en HCl 0,1 M y titularlo con NaOH 0,1 M bajo permanente burbujeo de nitrógeno y monitoreando los valores de pH (pHmetro Orion Star™) hasta llegar a un valor de pH 6,0.

Se pesaron aproximadamente 0,20 g secos de Q y se disolvieron en HCl 0,1 M. Luego se enrasó a 100 mL con agua destilada y se agregaron 0,55 g de KCl para ajustar la fuerza iónica a 0,1 N. Por último, se tituló con NaOH 0,1 M (también ajustado a fuerza iónica 0,1 M KCl), en agitación continua y con burbujeo de N_2 . La titulación se realizó adicionando 0,5 mL de NaOH cada 2 minutos hasta alcanzar un pH 6,0, como fue sugerido por Jiang y col. (2003), para evitar que el material precipite y ocurra un error en las mediciones de pH.

Se grafica la curva de titulación potenciométrica obtenida y utilizando las ecuaciones 3.4 y 3.5 se obtiene otra gráfica de Y' en función de los mL del titulante añadidos. La ordenada al origen de la recta de ajuste en el rango de pH 2,4 a 3,32 de esta última gráfica permite determinar el volumen de HCl añadido en exceso (V_e).

$$Y' = \left(\frac{V_0 + V}{C_B} \right) ([\text{H}^+] - [\text{OH}^-]) \quad \text{Ec. (3.4)}$$

$$V = V_e + Y' \quad \text{Ec. (3.5)}$$

Donde:

V = mL de NaOH utilizados para titular el Q

V_e = mL de HCl en exceso que se obtiene de la regresión lineal

V_0 = mL iniciales cuando se inicia la titulación

C_B = Concentración de NaOH

$[H^+] = 10^{-pH}$

$[OH^-] = \frac{10^{-14}}{[H^+]}$

Luego, para determinar el grado de deacetilación (DA) del Q se utilizan las ecuaciones

3.6 y 3.7.

$$d = \frac{(C_1 V_1 - C_B V_e)}{1000} \quad \text{Ec. (3.6)}$$

$$DA(\%) = \frac{d}{\left(\frac{w - 161d}{204} + d\right)} \times 100 \quad \text{Ec. (3.7)}$$

Donde:

w = masa de muestra

V_I = Volumen de HCl adicionado

C_I = Concentración de HCl adicionado

161 = $P_M Q_{\text{deacetilado}}$

204 = $P_M Q_{\text{acetilado}}$

Finalmente, para determinar la densidad de carga del Q se utilizó la ecuación 3.8.

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$\rho_Q = (P_M Q_{\text{deacetilado}} * DA + P_M Q_{\text{acetilado}} * A) \quad \text{Ec. (3.8)}$$

(DA: Grado de deacetilación del Q y A: grado de acetilación del Q).

b) Titulación polielectrolítica directa

La titulación polielectrolítica directa se realizó como fue descrito anteriormente para el Xil (**sección 3.2.1.2 b**), pero en este caso se utilizó como titulante una solución estándar aniónica de PVSK. Para las titulaciones se preparó una solución de PVSK 200 μ N al pH y fuerza iónica de medición. En un vaso de precipitado se colocaron 10 mL de solución de Q (1,0 g/L) y se llevó a 150 mL (0,06 g/L) con solución de NaCl y se acondicionó al pH de estudio. Luego, se procedió a la titulación y cada 0,2 mL se registró el valor del potencial. Las curvas de titulación se realizaron por duplicado.

3.3. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LOS POLIELECTROLITOS

3.3.1. Determinación de la pureza del xilano

La **Tabla 3.2** muestra que la pureza del xilano comercial fue del 89,7% y que un 11,7% (p/p) de las impurezas presentes en la muestra comercial es debido a la lignina. La suma de estos dos componentes es de 101,4% cercana al 100% esperado. Además, otros azúcares, como glucosa o manosa, también podrían estar presentes en una concentración muy baja.

Tabla 3.2 Caracterización del xilano comercial utilizado.

	% (p/p _{xilano comercial}) (*)
xilosa _(en el polímero) (HPAEC-PAD)	78,6 ± 1,0
ácido 4-O-metilgluc. _(en el polímero) (Scott)	11,0 ± 0,2
Xilano (según HPAEC-PAD+Scott)	89,6
Lignina Soluble	8,84 ± 0,14
Lignina Insoluble + cenizas	2,81 ± 0,16

*Se indica el valor medio ± rango de dos réplicas del ensayo.

En el **ANEXO A.1** se encuentran los cromatogramas obtenidos y los cálculos realizados para determinar la pureza del xilano comercial.

3.3.2. Determinación de la densidad de carga del xilano

a) Método de Scott

El contenido de grupos ácidos 4-O-metilglucurónicos en el xilano comercial determinado por el método de Scott fue **0,110 ± 0,002 g ácido 4-O-metilglucurónico** (en el polímero)/ **g xilano seco**. A partir de este resultado se calculó la densidad de carga como se detalla a continuación:

$$\rho_{\text{XILANO}} = \frac{0,110 \text{ g ác. glucuronico anh./g xilano impuro}}{0,897 \text{ g xilano puro/g xilano impuro}} * \frac{1}{190 \text{ g/mol}} = \mathbf{0,64 \text{ meq/xilano puro}}$$

El valor promedio de dos determinaciones de la densidad de carga del xilano según método de Scott fue **0,65 ± 0,02 meq/g Xil**.

b) Titulación conductimétrica

En la **Figura 3.5** se muestra una de las curvas de titulación conductimétrica obtenida al agregar cantidades crecientes de titulante NaHCO₃ a una solución de xilano en medio ácido. La figura muestra que los primeros 10,9 mL del titulante utilizados corresponden al volumen necesario para neutralizar los protones provenientes del ácido clorhídrico agregado en exceso, y los 1,9 mL siguientes corresponden al volumen necesario para ionizar los ácidos glucurónicos del xilano.

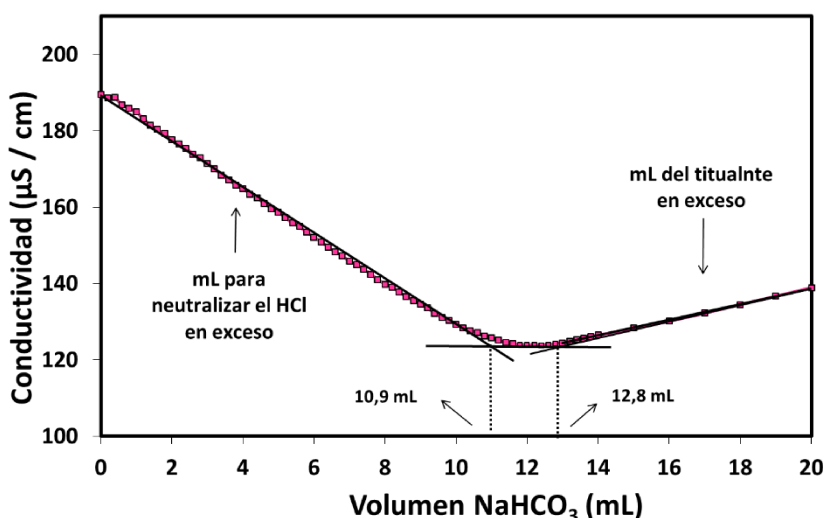


Figura 3.5. Curva de titulación conductimétrica del xilano obtenida para determinar el contenido de grupos ácidos totales, utilizando NaHCO₃ 0,01 N como titulante bajo continua agitación y burbujeo de nitrógeno.

Teniendo en cuenta la **ecuación 3.3.** y, los resultados obtenidos de la titulación se calculó la densidad de carga del xilano como se detalla a continuación:

$$\rho_{\text{XILANO}} = \frac{0,0108 \frac{\text{meqNaHCO}_3}{\text{mL}} * (12,8 - 10,9) \text{mLNaHCO}_3}{0,048 \text{ L} * 0,812 \frac{\text{gXILANO}}{\text{L}} * 0,913 \frac{\text{g.S}}{\text{g.h}} * 0,895 \frac{\text{g}_{\text{puros}}}{\text{g}_{\text{impuros}}}} = 0,64 \frac{\text{meq}}{\text{g}} \text{ Xil seco y puro}$$

El valor *promedio* de dos determinaciones de la densidad de carga del xilano según titulación conductimétrica fue de **0,66 ± 0,02 meq/g xilano.**

c) Titulación polielectrolítica directa a distintos valores de pH y fuerza iónica

La **Figura 3.6** muestra la curva de titulación polielectrolítica de una solución de Xil puro realizada a pH 6,0 y fuerza iónica 0,01 N NaCl, y utilizando como titulante una solución 236 µN de pDADMAC.

En este tipo de titulación se produce la formación gradual de complejos de polielectrolitos. Debido a que el pDADMAC es un polielectrolito lineal, fuerte, de alta densidad de carga y alto peso molecular (M_w : 400-500 kDa), y el xilano, a ese pH, puede considerarse mayoritariamente ionizado, se puede esperar una interacción cercana a la estequiométrica (1:1).

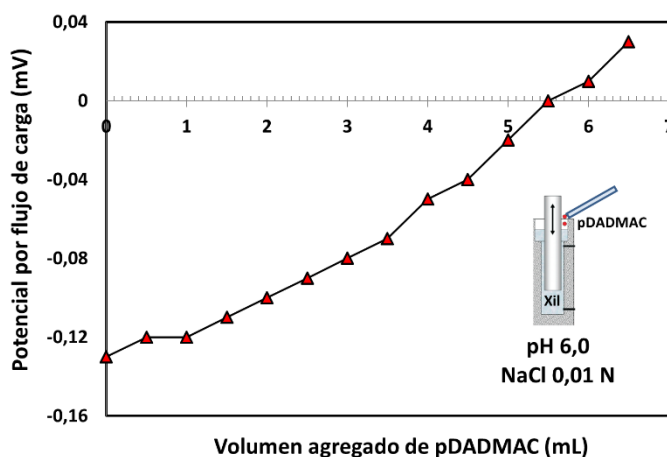


Figura 3.6. Determinación del potencial por flujo de cargas de una solución de Xil en función del volumen de titulante adicionado (235 µN pDADMAC) a pH 6,0 y 0,01N NaCl. El punto de equivalencia se alcanzó al agregar 5,5 mL de titulante.

Cálculos

$$V_{\text{pDADMAC}} * N_{\text{pDADMAC}} = V_{\text{Xil}} * N_{\text{Xil}}$$

$$N_{\text{Xil}} = \frac{5,5_{\text{mL}} * 0,235_{\text{meq/L}}}{4,12_{\text{mL}}} = 0,307 \text{ meq/L}$$

$$\rho_{\text{Xil}} = \frac{N_{\text{Xil}}}{C_{\text{Xil}}} = \frac{0,307_{\text{meq/L}}}{0,5_{\text{g/L}}} = 0,61 \text{ meq/g}$$

El valor promedio de dos determinaciones de la densidad de carga del xilano según titulación polielectrolítica a pH 6,0 y 0,01 N fue **0,61 ± 0,01 meq / g xilano**.

La **Tabla 3.3** resume los resultados de densidades de carga del Xil obtenidos por titulación polielectrolítica utilizando distintas condiciones del medio líquido. Se evaluó el efecto del pH (pH 5,0 y pH 6,0), y el efecto de dos fuerzas iónicas (0,01 N y 0,1 N NaCl a pH 6,0). La tabla muestra que al reducir el pH de 6,0 a 5,0, la densidad de carga del Xil se redujo significativamente ($p=0,005 < 0,05$ según test de comparación simple). Esto se debe a que los grupos carboxílicos del polímero se encuentran mayoritariamente ionizados a pH 6,0 pero, en

menor medida a pH más ácido. Por otro lado, es de esperar un incremento del grado de ionización a ese pH, debido al incremento de la fuerza iónica desde 0,01N a 0,1 N NaCl. Sin embargo, para pH 6,0, el método no establece diferencias significativas entre los valores obtenidos ($p=0,061 >0,05$).

La tabla también resume los valores de las densidades de cargas obtenidas utilizando los otros dos métodos. Los valores obtenidos por métodos de Scott y conductimétricos, en los cuales se cuantifica el total de grupos ácidos presentes, son similares a los obtenidos por titulación polielectrolítica a pH 6,0 (0,01N NaCl y 0,1N NaCl).

Tabla 3.3. Densidades de carga del xilano determinadas por titulación polielectrolítica utilizando como titulante pDADMAC (M_w : 400-500 kDa) y a distintos valores de pH y fuerza iónica. Se indican además los valores obtenidos por el método de Scott y por titulación conductimétrica que corresponden a la ionización total del Xil.

Técnica utilizada	pH	Xilano (meq/g)*
Titulación Polielectrolítica	pH 5,0 - NaCl 0,01 N	-0,39 ± 0,04
	pH 6,0 - NaCl 0,01 N	-0,61 ± 0,01
	pH 6,0 - NaCl 0,1 N	-0,72 ± 0,04
Método de Scott		-0,65 ± 0,02
Titulación conductimétrica		-0,66 ± 0,02

*Se indica el valor medio ± rango de dos réplicas del ensayo.

3.3.3. Determinación de la densidad de carga del quitosano

a) Titulación potenciométrica

Se realizó la titulación potenciométrica propuesta por Jiang y col. (2003), utilizando NaOH 0,1 M como titulante en atmósfera de nitrógeno y bajo agitación continua.

Inicialmente la solución de Q se encuentra con un exceso de HCl para asegurar la cationización de todos los grupos aminos. A medida que se adiciona el titulante, se neutraliza el exceso de HCl adicionado y luego se neutralizan los grupos aminos de las cadenas de Q.

La **Figura 3.7 a)** muestra una curva de titulación potenciométrica obtenida. A partir de la misma y utilizando las **ecuaciones 3.4 y 3.5**, se graficó la curva que se muestra en la **Figura 3.7 b)** y se determinó el volumen en exceso (V_e) de HCl adicionado a la solución inicial de Q. En este caso el valor correspondiente fue de 16,75 mL.

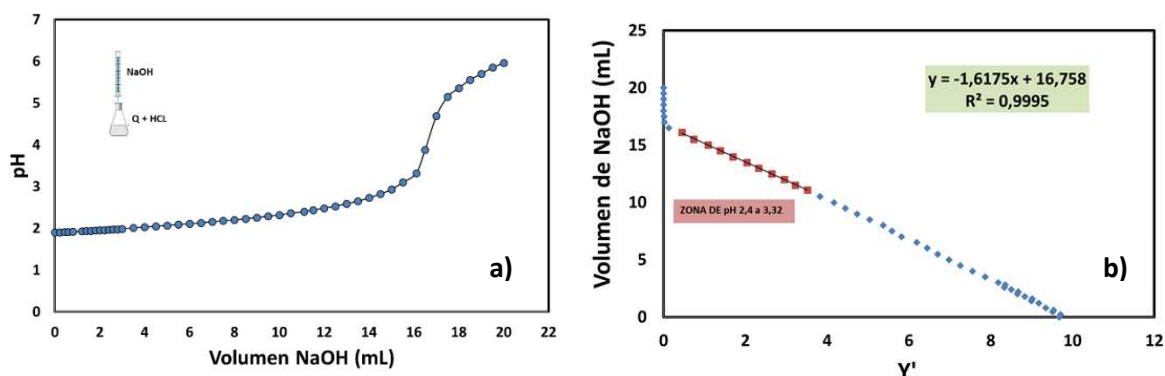


Figura 3.7. a) Curva de titulación potenciométrica del Q utilizando NaOH 0,1 M como titulante; **b)** Regresión lineal en la zona de pH entre 2,4-3,2 utilizada para la determinación del volumen de HCl en exceso (V_e) presente en la solución inicial de Q.

Luego, con los resultados obtenidos se pudo determinar el grado de deacetilación del Q utilizando las ecuaciones 3.6 y 3.7.

El valor promedio de tres réplicas del grado de deacetilación (DA) del Q obtenido fue de $79,6 \pm 0,7$ %. Este valor indica que el material se encuentra altamente deacetilado.

Finalmente, la densidad de carga del quitosano se calculó utilizando la **ecuación 3.8**.

$$\rho_Q = (PM_{Q_{deacetilado}} * 0,796 + PM_{Q_{acetilado}} * 0,204) = 5,89 \text{ meq/g quitosano}$$

b) Titulación polielectrolítica a distintos valores de pH y fuerza iónica

La **Figura 3.8** muestra una curva típica de la titulación polielectrolítica de una solución de quitosano diluida a pH 5,0 y fuerza iónica 0,01 N NaCl, y utilizando como titulante una solución estándar de PVSK (200 μ N).

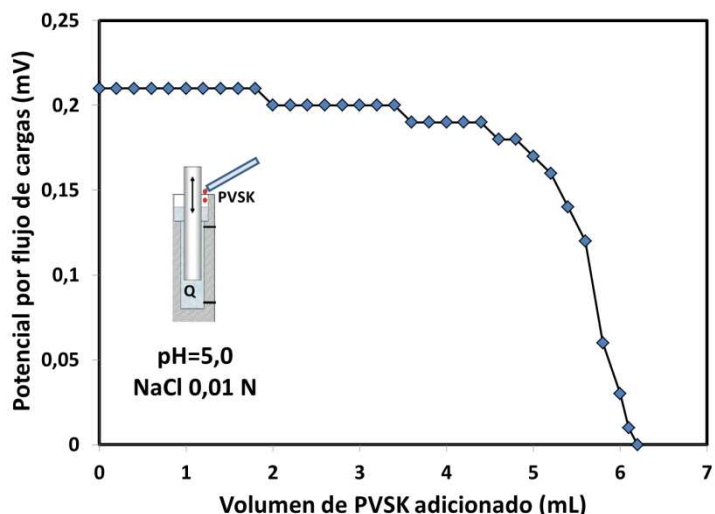


Figura 3.8. Determinación del potencial por flujo de cargas de una solución de Q en función del volumen del titulante adicionado (PVSQ 200 μ N) a pH 5,0 y 0,01N NaCl. El punto de equivalencia se alcanzó al agregar 6,2 mL de titulante.

Cálculos

$$V_{PVSQ} * N_{PVSQ} = V_Q * N_Q$$

$$N_Q = \frac{6,2_{mL} * 0,200 \text{ meq/L}}{0,123_{mL}} = 10,0 \text{ meq/L}$$

$$\rho_Q = \frac{N_Q}{C_Q} = \frac{10,0 \text{ meq/L}}{2,49 \text{ g/L}} = 4,04 \text{ meq/g}$$

El valor promedio de dos determinaciones fue de **4,03 \pm 0,01 meq / g quitosano**.

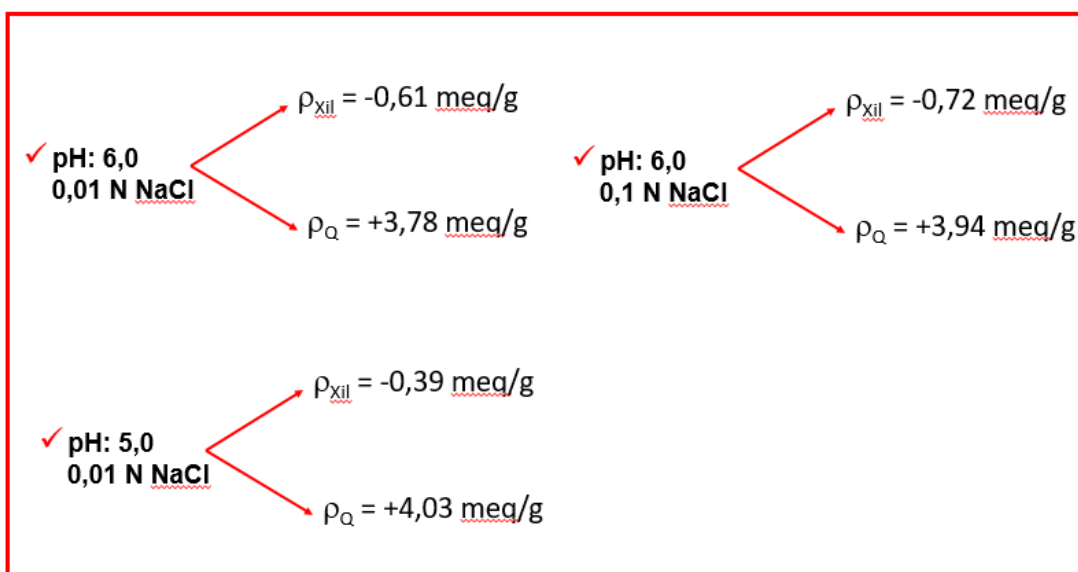
La **Tabla 3.4** resume los resultados de densidades de carga del Q obtenidas a distintos valores de pH (pH 5,0 y pH 6,0) y a dos fuerzas iónicas (0,01 N y 0,1 N NaCl a pH 6,0). La tabla muestra que al aumentar el pH de 5,0 a 6,0, la densidad de carga del Q disminuyó levemente debido a que los grupos aminos se encuentran menos ionizados a pH alcalino. Según el test de comparación simple existe diferencia significativa entre los valores obtenidos a los distintos pH ($p=0,04 < 0,05$). No obstante, cuando la fuerza iónica del medio se incrementó de 0,01N a 0,1 N NaCl a pH 6,0, no hubo diferencia significativa entre los resultados ($p=0,3 > 0,05$). La tabla también muestra que los valores de densidad de carga del Q determinados por titulación polielectrolítica fueron menores al obtenido por titulación potenciométrica (5,43 meq/g quitosano). Esta diferencia puede deberse a que en las condiciones del medio líquido (pH y fuerza iónica) en las que se realizó la titulación polielectrolítica, los grupos aminos del Q no se encuentran completamente ionizados, incluso al pH más bajo estudiado (pH 5,0). Además, no puede descartarse la presencia de desviaciones en la estequiometría 1:1 durante la titulación polielectrolítica.

Tabla 3.4. Densidades de carga del Quitosano determinadas por titulación polielectrolítica utilizando 200 μ N PVSK como titulante y a distintos valores de pH (5,0 y 6,0). Se indica el valor de densidad de carga por titulación potenciométrica que corresponde a la ionización total del Q.

Técnica utilizada	pH	Quitosano (meq/g)*
Titulación polielectrolítica	5,0 (NaCl 0,01 N)	+ 4,03 \pm 0,01
	6,0 (NaCl 0,01 N)	+ 3,78 \pm 0,07
	6,0 (NaCl 0,1 N)	+ 3,94 \pm 0,03
Titulación potenciométrica		+ 5,89

*Se indican los rangos de dos réplicas del ensayo

Para el resto del trabajo, se usaron los valores de las densidades de cargas determinadas por la titulación polielectrolítica frente a los correspondientes polielectrolitos patrones fuertes (PVSK y pDADMAC) bajo las correspondientes condiciones de pH y fuerza iónica.




- A pH 6,0 y 0,01 N NaCl: la densidad de carga del Q resultó ser *seis* veces mayor que la del xilano.
- A pH 5,0 y 0,01N NaCl: la densidad de carga del Q resultó ser *diez* veces mayor que la del xilano.



CAPÍTULO 3

**PARTE B: OBTENCIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE LOS
COMPLEJOS DE POLIELECTROLITOS**



3.4. MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE POLIELECTROLITOS

3.4.1. Preparación de los complejos de polielectrolitos

Para la obtención de los complejos de polielectrolitos, se utilizó un mecanismo similar al propuesto por Gärdlund y col. (2007) y Ankerfors (2008). Los complejos se obtuvieron mediante el método de adición gota a gota (*by dropwise addition*) y utilizando una bomba de jeringa para agregar la solución aniónica (Xil) o la solución catiónica (Q) sobre una solución conteniendo el polielectrolito de carga opuesta a un caudal de 40 mL/h. La formación de los complejos se realizó bajo agitación controlada (400 rpm) utilizando una Jarra Dinámica BRIT de Drenaje Mark III (Figura 3.9).

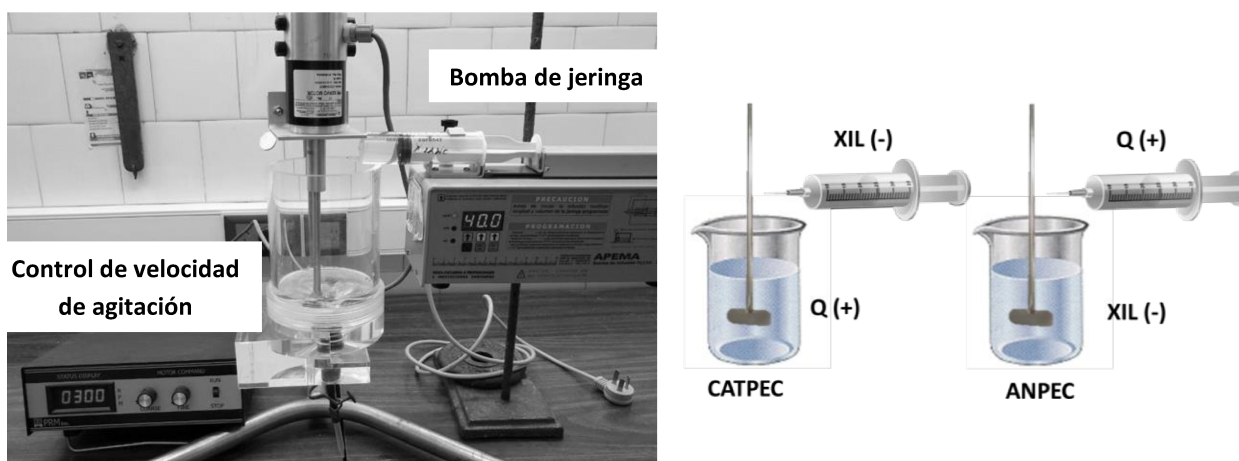
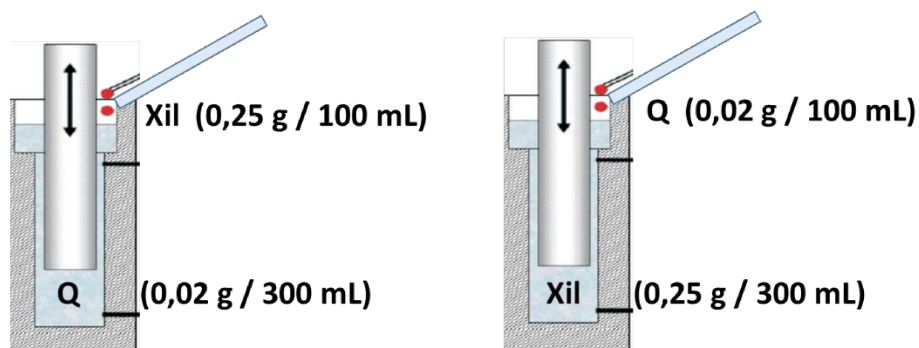


Figura 3.9: Preparación de los complejos de polielectrolitos catiónicos y aniónicos de Xil/Q mediante el método de adición gota a gota a un caudal de 40 mL/h y bajo agitación continua.

3.4.2. Monitoreo de la formación gradual de los complejos de Xil/Q mediante medidas de potencial por flujo de cargas

La formación gradual de los complejos fue monitoreada de forma directa mediante medidas de potencial por flujo de cargas utilizando el equipo Chemtrac (CCA 3100). Se tomaron mediciones de mV a medida que se adicionó, con una microbureta, la solución de Xil o Q sobre la solución de Q o Xil (según corresponda el orden de adición) y bajo agitación continua.

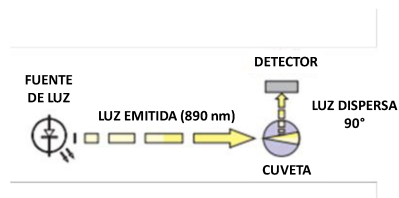
Las concentraciones de los polielectrolitos utilizados se muestran en el **esquema 3.1**. Las mediciones se realizaron a dos pH (pH 5,0 y pH 6,0) y a dos fuerzas iónicas (0,01 N y 0,1 N NaCl a pH 6,0) y se realizaron por duplicado.



Esquema 3.1. Concentraciones utilizadas de los polielectrolitos Xil y Q para el monitoreo de la formación gradual de los complejos de polielectrolitos mediante medidas de potencial por flujo de cargas.

3.4.3. Monitoreo de la formación gradual de los complejos de Xil/Q mediante medidas de turbidez

La formación de los complejos también fue monitoreada mediante mediciones de turbidez utilizando un Turbidímetro (Hanna HI93703 C), como fue reportado por otros autores (Hubbe y col. 2005). La fuente de luz es un diodo LED de infrarrojos con una longitud de onda de 890 nm. Un sensor, posicionado a 90° con respecto a la dirección de la fuente de luz, detecta la cantidad de haces de luz que han sido desviadas en ángulo recto por las partículas no disueltas en la solución. El microprocesador convierte la medida en valores de NTU (*Nephelometric Turbidity Unit*).



Esquema 3.2. Esquema del funcionamiento del turbidímetro (Turbidímetro Hanna HI93703C).

Para construir la curva de turbidez, cada 10 mL del polielectrolito adicionado (Xil o Q) al polielectrolito en exceso (Q o Xil) bajo agitación continua (400 rpm) y a un caudal de 40 mL/h, se realizaron medidas de turbidez sobre una alícuota de la suspensión del complejo formado. Los

valores de turbidez obtenidos fueron el promedio de tres medidas realizadas luego de agitar manualmente la cubeta entre cada medida. Con el promedio de los valores se obtuvo una curva de turbidez en función de las relaciones de masa Xil/Q o Q/Xil según corresponda el orden de adición.

3.4.4. Preparación de los complejos catiónicos y aniónicos con 30 % de neutralización de cargas (30 %N)

Para la obtención de PECs catiónicos (CatPECs) a pH 6,0 y fuerza iónica 0,01 N NaCl, se utilizó el dispositivo de la **Figura 3.9**. Se adicionó gradualmente un volumen de 19 mL de solución de Xil (2,5 g/L) a 300 mL de solución de Q (0,066 g/L) que se encuentra bajo agitación controlada. La relación de masa se corresponde con el 30% de neutralización de cargas del Q, determinado con el monitoreo por medidas de potencial por flujo de cargas. Para la obtención de CatPECs a mayor fuerza iónica (0,1 N NaCl), se agregaron 23 mL de solución de Xil.

Para la obtención de los PECs aniónicos (AnPECs) en ambas fuerzas iónicas, se procedió de manera inversa, a 300 mL de solución de Xil (0,83 g/L) se le adicionó 29 mL de solución de Q (0,2 g/L). En este caso, la relación de masa usada se corresponde con el 30% de neutralización de cargas del Xil.

Todos los polielectrolitos fueron previamente acondicionados al pH y fuerza iónica de trabajo.

3.4.5. Caracterización de los complejos catiónicos y aniónicos (30 %N) de neutralización de cargas

3.4.5.1. Espectroscopia DRIFT

El material seco molido fue analizado por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier de reflectancia difusa (DRIFT) utilizando un espectrómetro Shimadzu FTIR-8000, equipado con un detector MCT enfriado con nitrógeno líquido. Las condiciones del ensayo fueron

40 escaneos con una resolución de 4 cm^{-1} . Los experimentos se realizaron por formación de una película por evaporación del agua a partir de las suspensiones de los complejos. Luego, las películas fueron molidas en un mortero.

Las determinaciones también se realizaron a los polielectrolitos de Xil y Q de la misma manera. Para este caso, se formó una película a partir de una solución de $2,5\text{ g/L}$ y de 1 g/L (acondicionada al pH de estudio) para el xilano y quitosano, respectivamente y luego las películas fueron molidas en un mortero.

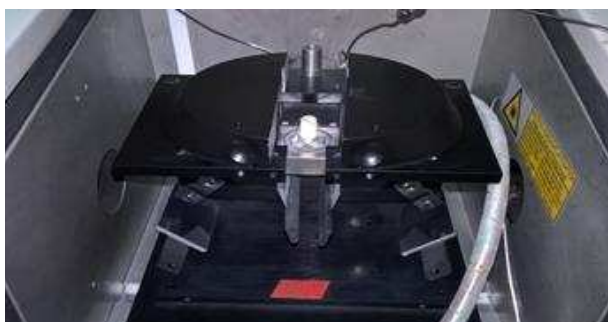


Figura 3.10. Dispositivo DRIFT abierto para permitir la colocación de la muestra.

3.4.5.2. Determinación de la densidad de carga

La densidad de carga de los complejos se determinó utilizando titulación polielectrolítica directa mediante medidas de potencial por flujo de cargas, para detectar el punto de equivalencia.

Para determinar la densidad de carga de CatPECs se utilizó como titulante $200\ \mu\text{N}$ PVSK y para determinar la densidad de carga de AnPECs se utilizó como titulante $235\ \mu\text{N}$ pDADMAC.

3.4.5.3. Determinación del tamaño de partícula y del potencial zeta

El tamaño de partícula promedio y el potencial zeta de los PECs se determinó utilizando un equipo de dispersión de luz dinámico (DLS) Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instrument, U.K).

Para medir tamaño de partícula promedio, el equipo registra, a un ángulo de 90 grados, la dispersión de luz dinámica producida por el movimiento Browniano de las partículas de la muestra. La curva de distribución de intensidad se utilizó para informar el tamaño de partícula

promedio y la curva de distribución de volumen para informar las cantidades relativas del material en cada pico (Malvern manual).

Por otro lado, para medir el potencial zeta el equipo utiliza la técnica de microelectroforesis de láser Doppler. Se utilizó el modelo de Smoluchowski para calcular los valores del potencial zeta, y los parámetros empleados fueron: 78,6 constante dieléctrica ($C^2/N.m^2$) y viscosidad de 0,8910 cP y 0,9002 cP para 0,01N y 0,1 N NaCl, respectivamente. El índice de refracción del agua (1,334) se utilizó debido al alto contenido de agua presente en las partículas de PECs (Cegnar y Ker 2010).

Para realizar las mediciones de tamaño de partícula y potencial zeta, los AnPECs se diluyeron a una concentración de 0.02 g/L utilizando NaCl a la misma concentración y pH del PECs analizado, mientras que los CatPECs se midieron directamente sin dilución. Se realizaron cinco mediciones del tamaño de partícula y potencial zeta de los PECs preparados a una temperatura de 25°C.

3.4.5.4. Determinación de la estabilidad coloidal

La estabilidad coloidal de los complejos se determinó utilizando un equipo Turbiscan Classic en las condiciones de pH y fuerza iónica a los que fueron preparados.

El equipo cuantifica la transmisión y dispersión de luz a lo largo del tiempo y a lo largo de un tubo vertical de 60 mm donde se coloca la muestra. El equipo consiste en una fuente de luz, que es un diodo electroluminiscente con longitud de onda dentro del infrarrojo cercano (850nm) que incide sobre la muestra, desplazándose hacia arriba y abajo a lo largo del tubo vertical. Dos sensores ópticos sincronizados con la fuente de luz reciben respectivamente la luz transmitida a través de la muestra (a 180 ° de la luz incidente, sensor de transmisión incidente) y la luz dispersada por la muestra (a 45° a partir de la radiación incidente, detector de retrodispersión).

Las mediciones se realizaron inmediatamente después de la preparación de los complejos (0 horas), y luego de 1 hora y 48 horas, antes y después de agitar manualmente el tubo. Se consideró la concentración original de los complejos (0,02 g CatPEC /L y 0,07 g AnPEC /L).

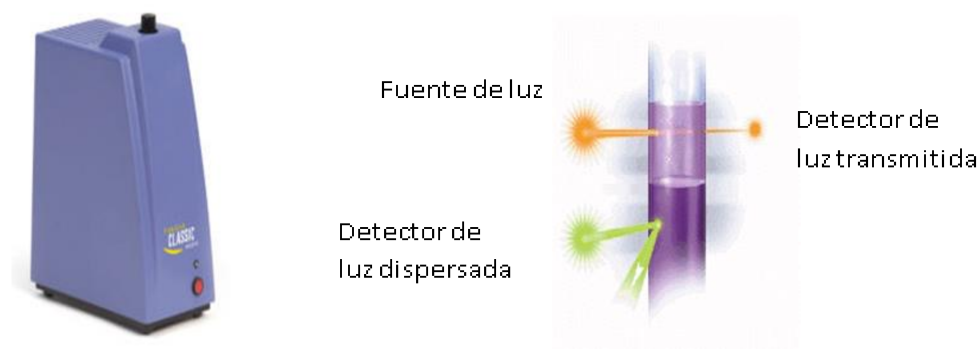


Figura 3.11. Equipo Turbiscan utilizado para realizar las medidas de estabilidad coloidal.

3.5. RESULTADOS DE LA OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS XILANO/QUITOSANO

3.5.1. Monitoreo de la formación gradual de los complejos Xil/Q a través de medidas de potencial por flujo de cargas

- Efecto de la fuerza iónica

En las **Figuras 3.12 a) y b)** se muestra el efecto en la señal del potencial por flujo de cargas cuando se adicionó solución de Xil a la solución de Q a pH 6,0 y a dos fuerzas iónicas (0,01 N y 0,1 N NaCl). Cuando la fuerza iónica de las soluciones fue 0,01 N se observa una leve desviación de la estequiometría (relación de cargas 0,9 meq Xil / meq Q; relación de masas: 5,6 g Xil / g Q) cuando se alcanza el valor “0” en el potencial por flujo de cargas.

Teniendo en cuenta el mecanismo de formación de PECs propuesto por Schatz y col. (2004), los resultados obtenidos sugieren que algunas cargas catiónicas del Q se encuentran

inaccesibles para el Xil y permanecen libres en la estructura del complejo y no son activas para efectos coloidales dinámicos del PFC.

Cuando la fuerza iónica del medio se aumenta a 0,1 N NaCl se puede observar en la figura una elevada desviación de la estequiometría hacia valores mayores (relación de cargas: 1,6 meq Xil / meq Q; relación de masas: 8,9 g Xil / g Q), es decir, que para alcanzar el valor de "0" en el potencial por flujo de cargas se tuvo que agregar mayores cantidades de xilano. Esto puede adjudicarse a que principalmente las cargas del Xil se encuentran "apantalladas" (*screened*) por la alta concentración de iones presentes en el medio líquido. Esto provoca que el xilano, de baja densidad de carga, adquiera una conformación más enrollada y no logre acceder a las cargas de Q. En este caso son las cargas del xilano las más perjudicadas en su participación en el fenómeno coloidal.

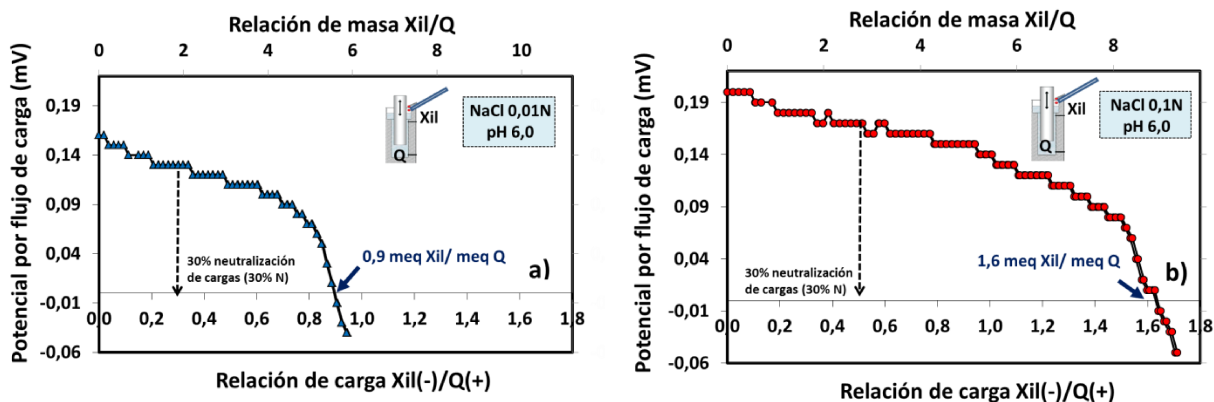


Figura 3.12. Efecto en el potencial por flujo de cargas (PFC) de la adición de una solución de Xil sobre la solución de Q a pH 6,0 y a dos fuerzas iónicas **a)** 0,01N y **b)** 0,1 N NaCl. Las cargas consideradas de Xil y Q son calculadas teniendo en cuenta las densidades de carga determinadas previamente por titulación polielectrolítica.

- Efecto del orden de agregado de los polielectrolitos

En la **Figura 3.13 a) y b)** se muestra el efecto en la señal del potencial por flujo de cargas cuando se invirtió el orden de agregado de los polielectrolitos, es decir, cuando se adicionó solución de Q (0,2 g/L) a la solución de Xil (0,83 g/L) a pH 6,0 y a dos fuerzas iónicas (0,01 N y 0,1 N NaCl).

Si comparamos las curvas de complejación gradual para los diferentes órdenes de adición (**Figuras 3.12 a y b**) podemos observar que cuando se adicionó solución de Q de alto peso molecular a la solución de Xil de bajo peso molecular, la desviación a la estequiometría 1:1 resultó ser mucho más marcada, y se produjo hacia valores menores de relación de cargas.

Teniendo en cuenta el mecanismo propuesto por Schatz y col. (2004), vemos que, al agregar la mitad de las cargas del Q necesarias para alcanzar el punto de neutralidad, se obtuvo el valor de "0" en el PFC, indicando una temprana floculación de las partículas. Por otro lado, se puede observar que, con el aumento de la fuerza iónica del medio a 0,1 N NaCl, la desviación resultó ser aún más marcada.

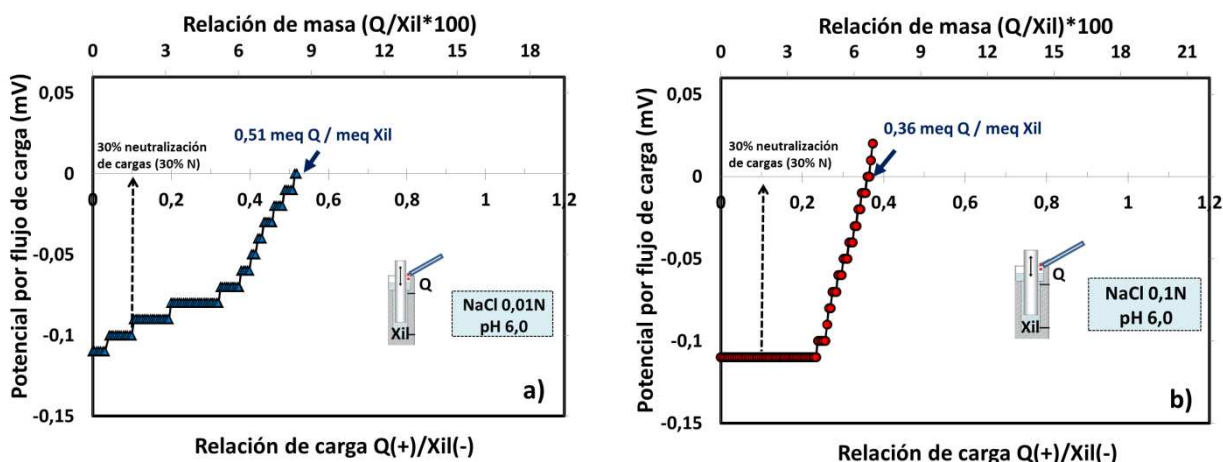


Figura 3.13. Efecto en el potencial por flujo de cargas (PFC) de la adición de una solución de Q sobre la solución de Xil a pH 6,0 y a dos fuerzas iónicas **a)** 0,01N y **b)** 0,1 N NaCl. Las cargas consideradas de Xil y Q son las determinadas previamente por titulación polielectrolítica.

Se puede decir que, tanto el aumento de la fuerza iónica del medio, como la adición del polielectrolito de mayor peso molecular (Q) al de menor peso molecular (Xil) conducen a mayores desviaciones de la estequiometría 1:1.

Estos resultados se discuten en mayor medida en el punto 3.5.3.

3.5.2. Monitoreo de la formación gradual de los complejos Xil/Q a través de medidas de turbidez

- Efecto de la fuerza iónica

La **Figura 3.14** muestra los valores de turbidez en función de las relaciones de masa cuando se adicionó solución de Xil a la solución de Q que se encontraba en exceso, a pH 6,0 y a dos fuerzas iónicas (0,01 y 0,1 N NaCl). En la figura también se indican las relaciones de masas a las cuales la señal del potencial por flujo de cargas (PFC) dio cero.

Se puede observar que la curva no muestra un máximo claro en la turbidez. La turbidez aumenta gradualmente, lo que indica que desde el inicio se forman complejos coloidales. Si bien en la figura no se puede observar una clara meseta en los valores de turbidez, si se puede afirmar que no existe una redispersión de los coloides por la adición de cargas aniónicas en exceso luego del punto de neutralización de cargas. Este mismo comportamiento fue observado por Schatz y col. (2004) cuando agregó una solución de sulfato de dextrano (-) sobre una solución de quitosano de alto peso molecular.

Estos resultados indican que no es posible obtener partículas aniónicas por superación de la neutralidad de cargas utilizando este orden de adición de los polielectrolitos (solución de Xil sobre solución de Q). La figura también muestra que los valores de turbidez resultaron ser levemente menores cuando los complejos se formaron en un medio con alta fuerza iónica (0,1N NaCl).

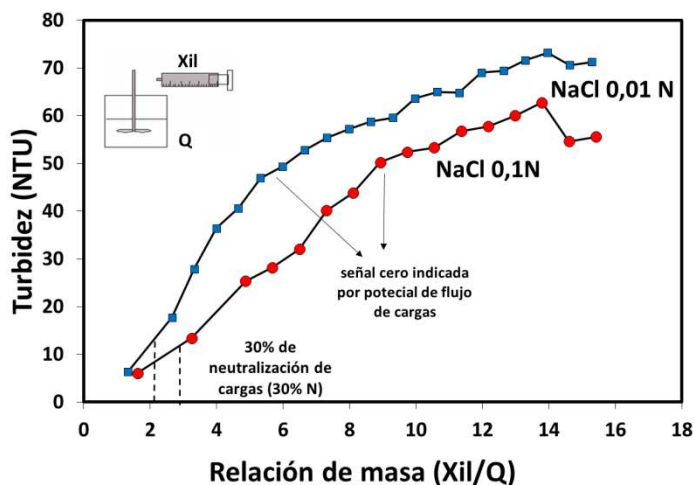


Figura 3.14. Formación de los complejos monitoreada por medidas de turbidez en función del agregado de xilano indicado por la relación de masa de Xil/Q (pH 6,0, dos fuerzas iónicas: 0,01 N y 0,1 N NaCl).

- Efecto del orden de agregado de los polielectrolitos

La **Figura 3.15** muestra los valores de turbidez en función de las relaciones de masa cuando se invirtió el orden de agregado de los polielectrolito, es decir, cuando se adicionó solución de Q a la solución de Xil, a pH 6,0 y a dos fuerzas iónicas (0,01 y 0,1 N NaCl).

Inicialmente también se observó un aumento gradual de la turbidez indicando la formación de partículas coloidales desde el inicio de la curva, hasta una relación de masa de 0,042 g Q/ g Xil, donde se observa un aumento pronunciado de los valores de turbidez.

Además, la **Figura 3.15** muestra que en este caso también los valores de turbidez fueron menores cuando se aumentó la fuerza iónica del medio. Pero en este caso, antes de alcanzar el punto de neutralidad (indicado por la titulación polielectrolítica) se observa una disminución en los valores de turbidez. Esta disminución coincidió con la formación de grandes agregados que se observaron visualmente.

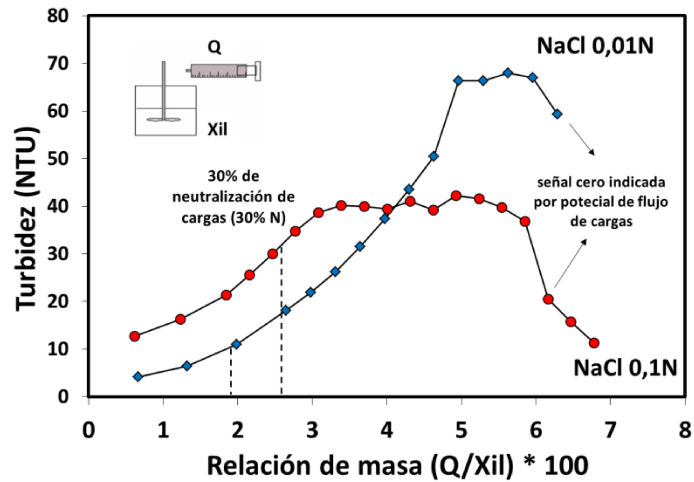


Figura 3.15. Formación de los complejos monitoreada por medidas de turbidez en función de la relación de masa de Q/Xil a pH 6,0 y a dos fuerzas iónicas 0,01 N NaCl.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, a continuación, se proponen mecanismos de formación de complejos de polielectrolitos según el orden de agregado de los mismos:

3.5.3. Mecanismo propuesto para la formación de complejos de Xil/Q

-Adición Xil sobre Q

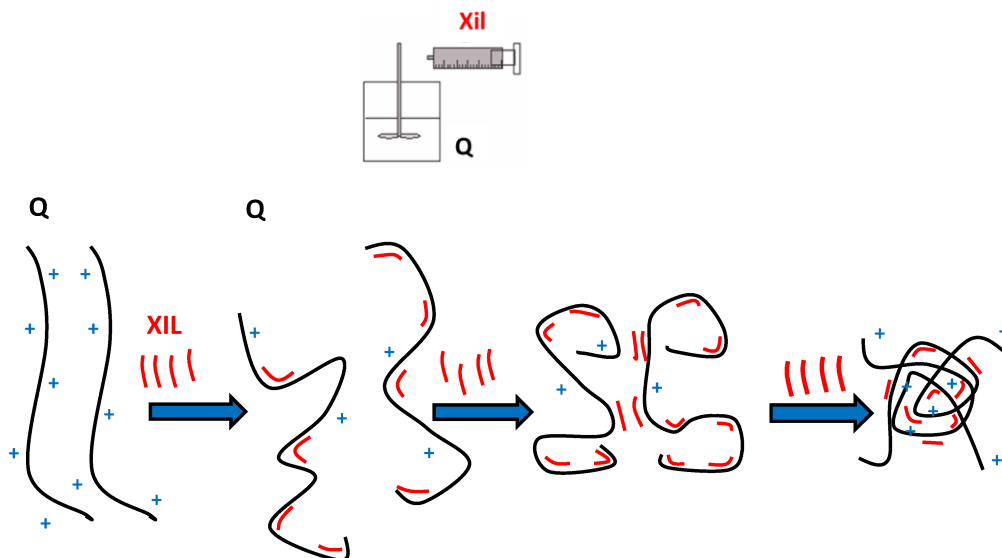


Figura 3.16. Esquema de la formación de los complejos CatPEC.

Ambos polielectrolitos utilizados son débiles, naturales y presentan una masa molecular marcadamente diferente (~20 Kg/mol el xilano y ~190 Kg/mol el quitosano). Se espera que el

mecanismo dominante en la formación del complejo es que el polímero de mayor masa molar, el quitosano, actúe de huésped de los polímeros de xilano que son gradualmente incorporados a la solución y están así en defecto.

Si se limita el agregado de xilano a una relación de masas xilano/quitosano alejada del punto de neutralidad los complejos coloidales serán estables. Idealmente se podrá obtener un complejo a partir de cada cadena polimérica de quitosano. La distribución de tamaño medio de complejos sería monomodal.

Como se mencionó en las curvas de PFC la desviación en la estequiometría es en perjuicio del quitosano observada cuando la fuerza iónica del medio fue de 0,01 N NaCl. Sin embargo, a mayor fuerza iónica (0,1 N), la desviación es en perjuicio del xilano.

En un estado avanzado de neutralización de cargas, los complejos pueden asociarse y formar agregados ya que la repulsión entre ellos es baja. Esto será más evidente en el punto de neutralidad.

-Adición Q sobre Xil

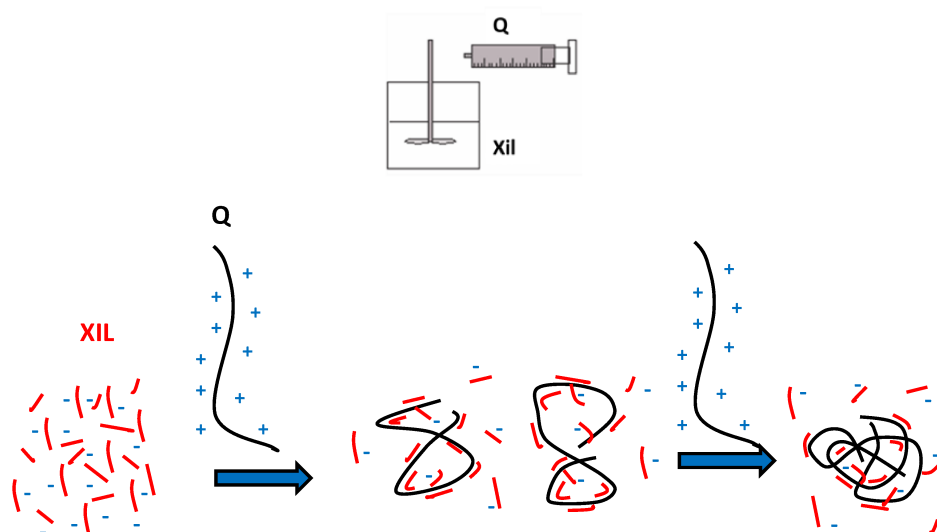


Figura 3.17. Esquema de la formación de los complejos AnPEC.

En este caso el agregado gradual de una solución de quitosano sobre una solución de xilano puede conducir también a la formación de complejos coloidales estables en una relación

inicialmente alejada del punto de neutralidad. La presencia de cadenas de xilano en exceso en solución conducirá a complejos con cargas aniónicas en exceso. Según las desviaciones de la estequiometría mostradas en las curvas de PCF, algunas de las cargas del xilano parecen no poder participar en los efectos coloidales del complejo, requiriéndose así, una cantidad de Q menor a la estequiométrica.

3.5.4. Preparación de complejos de polielectrolitos catiónicos y aniónicos con 30 % de neutralización de cargas (30 %N)

Teniendo en cuenta las curvas de potencial por flujo de cargas mostradas anteriormente (**Figuras 3.12 y 3.13**), se prepararon, por un lado, complejos de polielectrolito catiónicos agregando la solución de xilano sobre la solución de quitosano en exceso, hasta alcanzar una relación de masas correspondiente a un 30% de neutralización (CatPECs (30% N)) de las cargas del quitosano. Dicha relación de masas fue 70 Xil: 30 Q (% p/p) para una fuerza iónica de 0,01 N NaCl y de 73 Xil: 27 Q para una fuerza iónica de 0,1 N NaCl.

Por el otro lado, se prepararon complejos de polielectrolito aniónicos agregando la solución de quitosano sobre la solución de xilano en exceso, hasta alcanzar la relación de masas correspondiente al 30% de neutralización (AnPECs (30%N)) de las cargas de xilano, la cual fue 98 Xil: 2 Q (% p/p), para ambas fuerzas iónicas.

3.5.5. Caracterización de los complejos catiónicos y aniónicos (30 %N) de neutralización de cargas

3.5.5.1. Espectroscopia DRIFT

En la **Figura 3.18** se muestran los espectros obtenidos por mediciones DRIFT del xilano (Xil), quitosano (Q), y de los complejos de polielectrolitos CatPECs (30%N) y AnPECs (30%N). En el espectro correspondiente al quitosano, se pueden observar las bandas características de absorción a 1645 cm^{-1} debido a la vibración de tensión -C=O (amida I), y en la región entre

1552 cm^{-1} –1579 cm^{-1} a las bandas asignadas a la vibración de flexión (N-H) de la amina primaria (2-amino glucosa) no acetilada y a la vibración de flexión N-H (amida II) (Karaaslan y col. 2012). En los CatPECs ambas bandas también se pueden observar.

Por otro lado, en el espectro del xilano solo, la vibración correspondiente al estiramiento del ácido glucurónico ionizado se encuentra en la misma zona (1625-1550 cm^{-1}) que las bandas características del Q, anteriormente mencionadas. Debido a la baja cantidad de masa de Q presente en el AnPECs (98 Xil/ 2 Q %p/p), se puede observar que el espectro es muy similar al del Xil solo.

Se observa, además, una banda ancha entre 3200-3500 cm^{-1} correspondiente a la vibración por tensión del enlace O-H para los espectros del Xil, del CatPECs y del AnPECs. Particularmente, en el espectro del Q esta banda se encuentra centrada en 3346 cm^{-1} debido a la superposición de las bandas correspondientes a la extensión de los enlaces N-H y O-H.

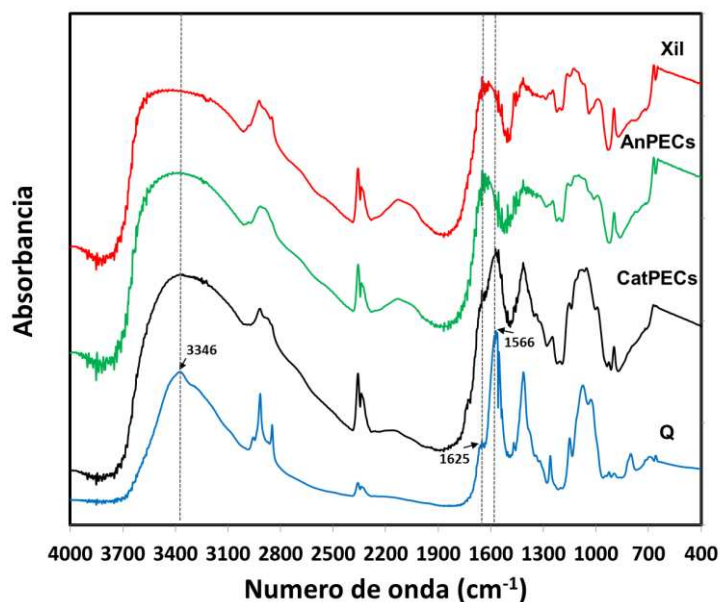


Figura 3.18. Espectro DRIFT de las películas de Q, Xil, CatPECs (30%N) y AnPECs (30%N) obtenidos mediante evaporación de agua a pH 6,0 y NaCl 0,01 N.

3.5.5.2. Determinación de la densidad de carga

En la **Tabla 3.5** se muestran las densidades de cargas medidas por titulación polielectrolítica y los valores de potencial zeta de los complejos catiónicos (30% N) y aniónicos (30% N) preparados a pH 6,0 y a distintas fuerzas iónicas del medio (0,01 N y 0,1 N NaCl).

Además, en la Tabla 3.5 se indican los valores de densidades de cargas esperadas de los complejos calculadas a partir de las densidades de cargas individuales de los polielectrolitos, que determinadas anteriormente con titulación polielectrolítica.

Se puede observar que los CatPECs (30% N) presentaron exceso de cargas catiónicas y los AnPECs (30% N) presentaron exceso de cargas aniónicas, como era de esperar. Sin embargo, los valores obtenidos resultaron ser menores a los calculados. Esto puede deberse a las desviaciones a la estequiometría 1:1 que se presentan durante la formación del PECs, ya mencionadas anteriormente. Además, no pueden descartarse la presencia de reconformaciones de los complejos durante la titulación.

Las bajas densidades de cargas obtenidas para todos los PECs mediante titulación polielectrolítica están en concordancia con los valores de potencial zeta. Recordemos que los valores de potencial zeta que se encuentran entre el rango de 10-30 mV está relacionado con complejos que presentan una incipiente inestabilidad.

Tabla 3.5. Densidad de carga de los PECs (30% N) determinadas por titulación polielectrolítica utilizando PVSK y pDADMAC como titulantes. Potencial Z de los PECs (30% N) determinado por dispersión de luz dinámica.

NaCl (N)	Complejo Preparado	Densidad de carga (meq/g)		Potencial Zeta (mV)(**)
		Valores esperados	Valores Experimentales (*)	
0,01	CatPECs (30% N)	+ 0,71	+ 0,56 ± 0,02	+14,7 ± 0,03
	AnPECs (30% N)	- 0,50	- 0,47 ± 0,02	-12,6 ± 0,06
0,1	CatPECs (30% N)	+ 0,55	+ 0,53 ± 0,02	+18,6 ± 0,04
	AnPECs (30% N)	- 0,63	- 0,48 ± 0,03	-9,5 ± 0,03

(*)Se indican los rangos de dos réplicas del ensayo

(**)Se indican los rangos de cinco réplicas del ensayo

3.5.5.3. Determinación del tamaño de partícula promedio

En la **Tabla 3.6** se muestran los resultados de tamaño de partícula promedio y el índice de polidispersidad de los CatPECs (30% N) y AnPECs (30% N) obtenidos utilizando un Nanozetasizer ZS90.

Se observa que cuando la fuerza iónica fue de 0,1 N se obtuvo una distribución bimodal en el tamaño de partícula para ambos complejos, indicando la formación de algunos agregados. En cambio, cuando la fuerza iónica fue de 0,01 N NaCl se observa una distribución monomodal del tamaño de partícula, para ambos PECs.

Particularmente cuando el Q, de mayor peso molecular, se encuentra en exceso (CatPECs), los tamaños de partícula promedio de los complejos fueron mayores que cuando el Xil se encontraba en exceso en el complejo (AnPECs). Este resultado coincide con lo expuesto por Schatz y col. (2004), quienes explicaron que al adicionar solución de Q de alto peso molecular sobre solución de sulfato de dextrano de bajo peso molecular, se forma una partícula estabilizada por las cargas libres del Q que constituyen la corona de la misma y el largo de estas cadenas de Q son el parámetro principal que determina el tamaño de partícula. Es decir que a mayor peso molecular del Q mayores fueron los tamaños del complejo obtenidos. En cambio, como se mencionó anteriormente, al revertir el orden de adición y sin modificar los pesos moleculares, se forman partículas que se neutralizan rápidamente y por lo tanto se obtiene una partícula más enrollada y con menor tamaño de partícula.

Tabla 3.6. Tamaño de partícula e índice de polidispersidad de los PECs (30% N) preparados a pH 6,0 y a dos fuerzas iónicas (NaCl 0,01 N y 0,1 N).

NaCl (N)	PECs (30%N)	Tamaño de partícula promedio (nm)(*)	Pdl
0,01	CatPEC (30% N)	387 ± 16 (100 %)	0,21
	AnPEC (30% N)	220 ± 4 (100 %)	0,16
0,1	CatPEC (30% N)	414 ± 29 (71,8 %)	0,24
		4904 ± 23 (28,2 %)	
	AnPEC (30% N)	302 ± 59 (74,9 %)	0,28
		4583 ± 346 (25,1 %)	

(*) La curva de distribución de tamaño de partícula de intensidad (PSD) se utilizó para informar el tamaño de cada pico y la curva de distribución de PSD de volumen para informar las cantidades relativas de cada pico en la distribución de acuerdo con las instrucciones del equipo. Se indican las desviaciones estándar de los promedios de seis réplicas del ensayo.

3.5.5.4. Determinación de la estabilidad coloidal

Las **Figuras 3.19 a) y b)** muestran la estabilidad de los complejos catiónicos medidos a pH 6,0 y a dos fuerzas iónicas (0,01 N y 0,1 N NaCl) utilizando un analizador óptico Turbiscan.

Las **Figuras 3.19 a) y b)** muestra que los CatPECs (30% N) son estables incluso luego de las 48 h de preparación. Se observa una incipiente inestabilidad de los complejos luego de transcurrido 7 días desde la formación de los mismos. Sin embargo, una agitación leve de los tubos revertió esta inestabilidad. La sedimentación y la redispersión subsiguiente a la agitación puede ser una ventaja práctica, ya que permite concentrar suspensiones con fines de almacenamiento y transporte.

Por otro lado, las **Figuras 3.20 a) y b)** muestran la estabilidad de los complejos aniónicos (30% N) medidos en las mismas condiciones mencionadas anteriormente para los CatPECs (30% N). Las gráficas muestran que los complejos aniónicos también son estables y que su comportamiento es muy similar al obtenido para los complejos catiónicos.

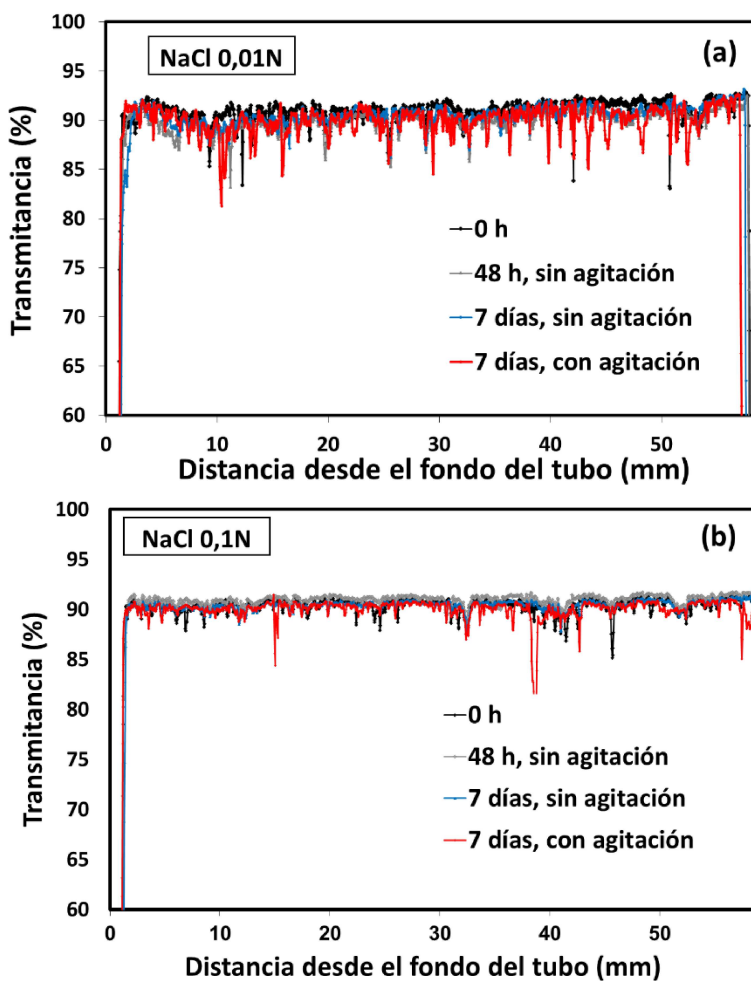
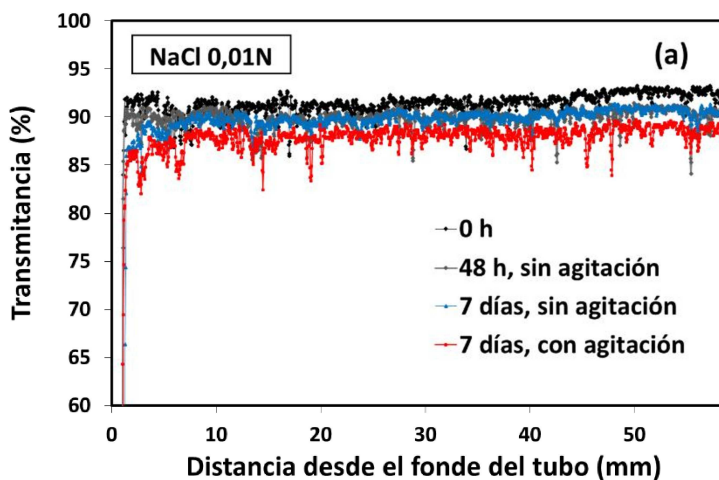


Figura 3.19. Estabilidad de los complejos catiónicos de *Xil/Q* (CatPECs 30% N): Transmisión de las soluciones en función de la distancia desde el fondo del tubo a pH 6,0 y fuerzas iónicas a) 0,01N NaCl y b) 0,1 N NaCl a diferentes tiempos.



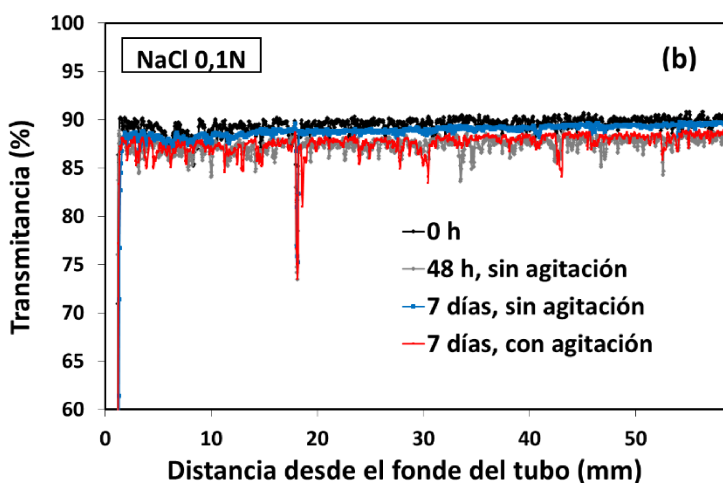


Figura 3.20. Estabilidad de los complejos aniónicos de Q/Xil (AnPECs 30% N): Transmisión de las soluciones en función de la distancia desde el fondo del tubo a pH 6,0 y fuerzas iónicas **a)** 0,01N NaCl y **b)** 0,1 N NaCl a diferentes tiempos.

3.6 CONCLUSIONES PARCIALES

Se caracterizaron los dos polielectrolitos lineales, débiles y naturales: el xilano y el quitosano.

La densidad de carga de ambos polielectrolitos se determinó utilizando diferentes técnicas. Utilizando la titulación polielectrolítica se determinó que la densidad de carga del quitosano resultó ser entre 6 y 10 veces mayor que la densidad de carga del xilano a pH 6,0 y pH 5,0, respectivamente.

El seguimiento de la formación de los PECs catiónicos y aniónicos mediante medidas de potencial por flujo de cargas, permitió observar que la interacción electrostática entre el Xil y el Q ocurre en condiciones no estequiométricas. Las mayores desviaciones a la estequiometría se presentaron cuando los polielectrolitos se encontraban en medios a alta fuerza iónica (NaCl 0,1 N) y cuando el polímero que inicialmente se encuentra en exceso fue el de menor peso molecular (Xil), es decir cuando se adicionó Q a la solución de Xil en exceso.

La forma de las curvas de turbidez en función a las relaciones de masas, mostraron que se obtienen complejos coloidales desde el principio de la adición gradual de un polielectrolito

sobre otro. La adición de un exceso de polielectrolito luego del punto de neutralidad de cargas, no permitió la reestabilización de los PECs.

Las determinaciones de densidades de cargas por titulación polielectrolítica, indicaron que los PECs catiónicos y aniónicos formados con un 70% de cargas libres presentaron una densidad de carga menor a la esperada, lo cual concuerda con el hecho de que la formación de los mismos presenta desviaciones a la estequiometría.

Los CatPECs y AnPECs formados a pH 6,0 y fuerza iónica de 0,01 N NaCl resultaron tener una distribución de tamaño de partícula unimodal y con valores en el rango de los 200-400nm. Sin embargo, la presencia de una mayor concentración de sales en el medio (0,1 NaCl) dio lugar a la formación de agregados.

La adición gota a gota de una solución de polielectrolito sobre la otra de carga opuesta permitió la obtención de suspensiones coloidales estables. Si bien todos los PECs formados con un 70% de cargas libres presentaron una incipiente inestabilidad luego de los 7 días, la misma mostró ser reversible con agitación.



CAPÍTULO 4

OBTENCIÓN DE PELÍCULAS PARA EMBALAJE



4.1. INTRODUCCIÓN

La producción global mundial de polímeros a base de combustibles fósiles ha alcanzado niveles sin precedentes. De acuerdo a *Plastics Europe* (2016), hasta el año 2015 la producción fue de 322 millones de toneladas. La mayoría de estos polímeros sintéticos no son biodegradables y como resultado se acumulan como residuos. Particularmente, entre 1950 y 2015 la generación de residuos acumulados provenientes de polímeros sintéticos ascendió a 6300 millones de toneladas, de las cuales sólo el 9% fue reciclado, el 12% fue incinerado y el restante 79% fue enviado como desecho (Geyer y col. 2017).

Los polímeros sintéticos desempeñan un papel importante en la sociedad, ya que presentan aplicación en casi todas las áreas de nuestra vida diaria. Según el reporte de *Plastics Europe* y como se muestra en la **Figura 4.1**, en el año 2016 las principales aplicaciones de polímeros termoplásticos sintéticos fueron para materiales de embalaje (39,9%) y para ser usado en construcción (20,5%). La figura también muestra otras aplicaciones.

Particularmente, con el objetivo de reducir el impacto de estos materiales de embalaje en el medio ambiente, en los últimos años ha aumentado significativamente la demanda de materiales de embalaje biodegradables.

En general, una película óptima para embalaje debe ser fácil de manejar y debe mostrar propiedades mecánicas aceptables en condiciones secas o húmedas. Por otro lado, dependiendo de su aplicación puede requerirse una película que presente alta velocidad de transferencia al vapor de agua (*water vapor transmission rate*, WTVR) si el material de embalaje va a ser utilizado para envasar frutas o vegetales, por el contrario, debe resistir a condiciones altas de humedad si el material va a ser almacenado en un ambiente húmedo (Goksu y col. 2007). Además, generalmente para evitar la degradación de los productos envasados, se buscan películas con buenas propiedades de barrera a los gases como el oxígeno (Gröndahl y col. 2004).

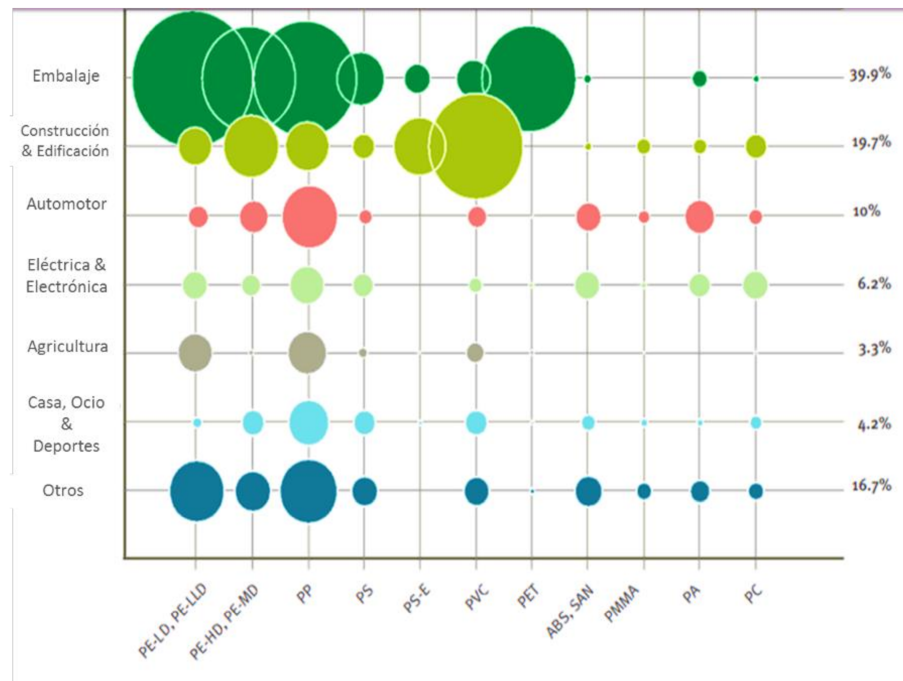


Figura 4.1. Principales aplicaciones de los polímeros termoplásticos en Europa en el año 2016 (Fuente: Plastics Europe) (PE-LD: polietileno de baja densidad; PE-HD: polietileno de alta densidad; PP: polipropileno; PS: poliestireno; PS-E: poliestireno expandido; PVC: cloruro de polivinilo; PET: tereftalato de polietileno; ABS: poli (estireno-co-acrilonitrilo-co-butadieno); SAN: poli (estireno-coacrilonitrilo); PMMA: polimetilmetacrilato; PA: poliamida; PC: policarbonato).

En particular, los polímeros sintéticos más comunes utilizados para el envasado de alimentos son el polietileno de alta densidad (HDPE) y baja densidad (LDPE), el polipropileno (PP), el poliestireno (PS), el cloruro de polivinilo (PVC) y el tereftalato de polietileno (PET), en forma de bolsas, botellas, bandejas, envases, películas y laminados. Estos envases son diseñados para prolongar la vida útil y mantener la calidad de los productos alimenticios. Además, deben ofrecer determinadas características como: buena procesabilidad, bajo costo y excelentes propiedades mecánicas y de barrera (gases y líquidos).

Por otro lado, se ha propuesto preparar películas “multicapas” con el objetivo de aprovechar las ventajas que presentan los distintos materiales. Por ejemplo, Ferguson y col. (1987) combinaron películas de copolímeros de etileno y alcohol vinílico (EVOH) con películas de polietileno de baja densidad (LDPE). Mientras que las primeras presentan la ventaja de tener baja permeabilidad al oxígeno y al dióxido de carbono (Muramatsu y col. 2003), las segundas

presentan la ventaja de tener buenas propiedades de barrera al vapor de agua (Mauer y Ozen 2004).

En los últimos años, el uso de biopolímeros como los polisacáridos ha recibido mayor interés para la obtención de películas debido a sus excelentes propiedades de barrera al oxígeno (Bourtoom 2008). Sin embargo, la mayoría de estos polímeros forman películas quebradizas. Para evitar este problema, se ha propuesto el agregado de elevadas cantidades de plastificantes (glicerol, sorbitol, sucrosa, fosfolípidos) cuyo objetivo es disminuir la temperatura de transición vítrea del material (T_g) y mejorar así la flexibilidad de las películas (Sothornvit 2015).

Uno de los plastificantes más utilizados es el glicerol debido a que es muy estable y compatible con las cadenas de biopolímeros (Campos y col. 2011). Si bien los plastificantes permiten mejorar la flexibilidad de las películas, existen desventajas del uso de estos compuestos. Particularmente, se ha comprobado que el glicerol es sumamente higroscópico, lo que provoca una disminución en las propiedades de barrera (Bergo y col. 2010). Por lo tanto, las cantidades adicionadas de plastificantes deben ser aquellas que permitan obtener una buena manipulación de la película, pero sin conducir a detrimentos excesivos en sus propiedades de barrera.

Específicamente, las películas preparadas con xilano solo poseen muy buenas propiedades de barrera al oxígeno, permeabilidad del aroma y alta transmisión de luz, que lo hacen muy interesante para la obtención de materiales de embalaje (Mikkonenn y Tenkanen 2012). No obstante, debido al bajo peso molecular, alta temperatura de transición vítrea (T_g :180°C), el xilano presenta una escasa capacidad para formar películas, resultando en la formación de películas rígidas (Gabrielii y col. 2000; Gröndahl y col. 2004).

Gröndhal y col. (2004) evaluaron las propiedades de películas de xilano (extraído de madera de álamo) utilizando sorbitol y xilitol en grandes cantidades (20-50%) como plastificantes. La adición del plastificante permitió la formación de películas transparentes, y flexibles, precisamente la adición de un 35% de sorbitol permitió disminuir la temperatura de transición vítrea a -26°C.

Otras propuestas para obtener películas menos quebradizas, han sido la combinación de los polisacáridos con otros polímeros. Particularmente, en el trabajo reportado por Gabrielli y col. (2000), las películas se prepararon por mezclado de polvos de xilano y quitosano, seguido de una disolución en un medio extremadamente ácido y evaluaron con éxito su capacidad para actuar como hidrogel cuando las cantidades de quitosano fueron menores al 20% (p/p). Estos autores mostraron que las interacciones iónicas entre los grupos amino del quitosano con los grupos ácidos glucurónico del xilano y las regiones cristalinas introducidas a través de las cadenas del xilano, proporcionan la estabilidad necesaria de los hidrogeles. Estos autores no evaluaron las propiedades mecánicas de los mismos. Luego, Karaaslan y col. (2010) y (2012) formaron hidrogeles de xilano y quitosano mezclando rápidamente soluciones de xilano y quitosano también en condiciones extremadamente ácidas. Informaron valores de resistencia a la rotura por tracción en seco de hasta 29 MPa, pero con muy baja elasticidad (valores de elongación hasta rotura inferiores al 3,6%).

Más recientemente, Luo y col. (2014) prepararon películas de quitosano solo (100% quitosano) en un medio extremadamente ácido, lo neutralizaron y lo sumergieron en soluciones de xilano a diferentes concentraciones (1-3% w/v). Estos autores informaron que las películas de quitosano recubiertas por xilano mostraron mejor resistencia a la tracción (71 MPa) y mejores propiedades de barrera al oxígeno cuando se lo compararon con películas preparadas con quitosano solo.

Por otro lado, ha habido un interés creciente en los últimos tiempos en desarrollar materiales con capacidad de formación de película y con propiedades antimicrobianas para mejorar la seguridad y la vida útil de los alimentos (Dutta y col. 2009). Este interés se atribuye a la creciente demanda en el consumo de alimentos mínimamente procesados y con escasos aditivos (Bastarrachea y col. 2011).

Particularmente, las películas a base de quitosano han demostrado ser muy efectivas en la conservación de alimentos. La presencia del grupo amino en la posición C2 del quitosano

proporciona una funcionalidad importante para las necesidades biotecnológicas, particularmente en aplicaciones alimentarias (Dutta y col. 2009).

Li y col. (2011) evaluaron el efecto antimicrobiano contra *E. coli* y *S. aureus* de las películas obtenidas por calentamiento de xilano y quitosano. No observaron efecto antimicrobiano para el xilano. Sin embargo, la actividad antimicrobiana del conjugado xilano-quitosano fue más alta que la del quitosano solo.

Teniendo en cuenta lo expuesto, en este trabajo de Tesis se propone obtener películas a partir de suspensiones estables de complejos de polielectrolitos obtenidas por agregado en forma gradual de la solución de xilano a la solución de quitosano en exceso. Se espera que el exceso de carga catiónica resulte clave para la estabilidad electrostática de los complejos de polielectrolitos necesaria para formar una película de fácil manipulación, homogénea y con buenas propiedades mecánicas. Se espera, además, que presenten buenas propiedades de barrera a los gases y efecto antimicrobiano.

De acuerdo con nuestros conocimientos, no existen estudios previos en los que se caracterice la suspensión de PECs obtenida por la combinación del xilano y del quitosano antes de la formación de la película. Bajo condiciones adecuadas de pH y fuerza iónica, es decir, bajo condiciones en las cuales ambos PE presentan su máximo grado de ionización, se puede esperar una fuerte interacción iónica entre los mismos durante la formación de los complejos de polielectrolitos. Esta interacción iónica, sumada a las regiones cristalinas logradas por interacciones puente de hidrógeno entre cadenas de xilano, puede proporcionar ventajas adicionales en términos de propiedades de las películas.

El objetivo del siguiente capítulo es obtener películas aptas para embalaje a partir de suspensiones de complejos de Xil/Q utilizando diferentes relaciones de masas.

Inicialmente se seleccionó el pH óptimo para formar las películas y luego se seleccionaron, a partir de una curva de potencial por flujo de cargas, cuatro relaciones de masas para la formación de los complejos de polielectrolitos catiónicos de Xil/Q. Se consideró necesario preservar las cargas catiónicas libres en los PECs, para lograr estabilidad de la suspensión de complejos.

Las suspensiones de PECs obtenidas con la adición de un bajo porcentaje de plastificante fueron caracterizadas mediante determinación del tamaño de partícula y densidad de carga. Luego, se caracterizaron las películas obtenidas a partir de las suspensiones con las diferentes relaciones de masa. Se evaluaron las propiedades de barrera a los gases y las propiedades mecánicas en húmedo de las mismas y se realizaron estudios de difracción de rayos X. Además, se evaluó la solubilidad, la estabilidad térmica, el efecto de la humedad relativa en sus propiedades y el efecto antimicrobiano de las películas.

4.2. MATERIALES

- Se utilizó el mismo xilano y quitosano, descriptos previamente en el capítulo 3, pero en este caso la solución de xilano se preparó a una concentración de 4 g/L y la solución de quitosano a 2,5 g/L en una solución de ácido acético de concentración 0,25 % (p/v).
- El resto de los reactivos utilizados fueron grado pro-análisis.

4.3. MÉTODOS

4.3.1. Determinación del grado de ionización del Xil y del Q en función del pH

Se realizaron titulaciones potenciométricas para determinar la constante de acidez pK_a del xilano y la constante de basicidad pK_b del Q utilizando un pH-metro *Thermo Scientific Orion 3-Star* con una precisión de 0,01.

Para la determinación del pK_a del Xil se preparó una solución de 1 g/L y se pasó a través de una resina de intercambio catiónico (TULSION T-42 NaFF), para garantizar que todos los grupos ácidos 4-O-metilglucurónicos del Xil se encuentren en su forma no ionizada. La resina fue previamente lavada con solución de HCl al 3,7% (p/p) durante 60 min y luego se lavó con agua destilada hasta alcanzar una conductividad en el filtrado menor a 5,0 $\mu\text{S/cm}$. Luego a la solución de Xil se le añadió una cantidad específica de KCl para ajustar la fuerza iónica a 0,1 M. Finalmente, la solución se tituló con NaOH 0,02 M (también ajustada a 0,1 M usando KCl) hasta pH 11,0 utilizando una microbureta en atmósfera de nitrógeno y con agitación continua. Se realizaron dos réplicas del ensayo.

Por otro lado, para las titulaciones potenciométricas del Q para determinar el pK_b se pesaron aproximadamente 0,20 g secos de Q y se disolvieron en HCl 0,104 M. Luego se enraso a 100 mL con agua destilada y se agregaron 0,55 g de KCl para ajustar la fuerza iónica a 0,1 N. Por último, se tituló con NaOH 0,102 M (también ajustado a fuerza iónica 0,1 M KCl), en agitación continua y con burbujeo de N_2 hasta pH 12 (Wang y col. 2011). Las mediciones se realizaron por triplicado.

Finalmente, el grado de ionización del xilano y del quitosano se determinó utilizando las ecuaciones 4.1 y 4.2, respectivamente.

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{\alpha}{1-\alpha}\right) \quad \text{Ec. 4.1}$$

$$pH = pK_b - \log\left(\frac{\alpha_b}{1-\alpha_b}\right) \quad \text{Ec. 4.2}$$

Donde:

α : es el grado de ionización del xilano

α_b : es el grado de ionización del quitosano.

pK_a : el logaritmo decimal negativo de la constante de disociación K del grupo ácido.

pK_b : el logaritmo decimal negativo de la constante de disociación K del grupo básico.

4.3.2. Preparación de las suspensiones de complejos de polielectrolitos catiónicos

Para la obtención de películas a partir de suspensiones coloidales, los complejos catiónicos se prepararon como fue detallado en el **capítulo 3 (sección 3.4.1)** utilizando una bomba de jeringa para agregar gradualmente la solución de xilano a la solución de quitosano (**Figura 4.2**). En este caso, se utilizaron soluciones de polielectrolitos más concentrados (4,0g/L Xil y 2,5g/L Q) para disminuir los tiempos de evaporación del agua durante el secado final de las películas. Además, se adicionó solución de glicerol preparada al 5% p/p (10% en peso en relación al peso seco total de los polímeros) como plastificante a la solución de quitosano, antes de la formación de los PECs. Las condiciones del medio durante la formación de los PECs fueron pH 5,0 y NaCl 0,03 N.

Luego, las suspensiones de complejos fueron homogenizadas durante 2 minutos (750W, 50% amplitud) utilizando un homogeneizador ultrasónico (Sonics & Materials).



Figura 4.2. Preparación de los complejos de polielectrolitos de Xil/Q a pH 5,0 y fuerza iónica 0,03 N para la obtención de películas.

4.3.3. Obtención de películas a partir de suspensiones de complejos catiónicos

Las suspensiones de PECs homogenizadas, se volcaron en moldes de silicona y se calentaron durante 10 minutos en un baño de agua a 70°C. Luego, se colocaron en un baño ultrasónico por un minuto para remover las burbujas de aire presentes. Los moldes fueron llevados a una estufa de circulación para evaporar de forma parcial el agua a 40°C y su secado

final se realizó bajo condiciones controladas de temperatura y humedad (23°C – 50%HR). Las películas fueron almacenadas en desecadores conteniendo una solución saturada de sal de magnesio ($Mg(NO_3)_2$) de manera de obtener una humedad relativa del 50%.

Además, se obtuvieron películas de complejos de Xil/Q sin la adición de glicerol y se formaron películas de referencia conteniendo solamente un componente, es decir se formaron películas conteniendo 100% Xil (100/0) y otras conteniendo 100% Q (0/100).

A continuación, en el **esquema 5.1** se detallan las relaciones de masas utilizadas para la obtención de las películas.

IDENTIFICACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE COMPLEJOS DE <u>Xil/ Q (% p/p)</u> :	
✓	0 Xil/100 Q (% p/p) --- 0/100
✓	70 Xil/30 Q (% p/p) --- 70/30
✓	75 Xil/25 Q (% p/p) --- 75/25
✓	80 Xil/20 Q (% p/p) --- 80/20
✓	85 Xil/15 Q (% p/p) --- 85/15
✓	100 Xil/0 Q (% p/p) --- 100/0

Esquema 5.1. Relaciones de masa seleccionadas para la obtención de las películas.

4.3.4. Caracterización de las películas de Xil/Q

A continuación, se resumen las propiedades evaluadas a las películas conteniendo diferentes relaciones de masa Xil/Q %(p/p) y un 10% de plastificante (p/p).

<i>Xil/Q %(p/p) +glicerol</i>	<i>OP</i>	<i>WVTR</i>	<i>Solub.</i>	<i>Prop. Mecánicas^(*)</i>	<i>DRX</i>	<i>TGA</i>	<i>DMA</i>	<i>DVS</i>	<i>SEM</i>	<i>Efecto antimicrob.</i>
0/100				X	X	X				
70/30	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
75/25	X	X	X	X	X					
80/20	X	X	X	X	X					
85/15	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
100/0				X	X	X				

OP: Permeabilidad al oxígeno; WTR: Velocidad de trasmisión de vapor de agua; DRX: Difracción de rayos X; TGA: Estabilidad térmica; DMA: Análisis mecánico dinámico; DVS: Absorción dinámica de vapor; SEM: Microscopía electrónica de barrido.

() Las propiedades mecánicas también se evaluaron a las películas luego de realizar un lavado y posterior secado. Además, se evaluaron las propiedades de las películas sin glicerol.*

Los ensayos de permeabilidad al Oxígeno (OP), análisis mecánico dinámico (DMA con control de humedad) y absorción dinámica de vapor (DVS) se realizaron en el Centro de Investigación Técnica (VTT), Otaniemi, Finlandia, y en la Universidad de Aalto, Otaniemi, Finlandia, en el marco de un Proyecto PICT 2013 N° 2212 y a través de una beca otorgada por PROVALOR-(CYTED) para realizar una estadía de investigación en el exterior.

4.3.4.1. Permeabilidad al oxígeno (OP)

Los ensayos de Permeabilidad al Oxígeno (OP) se realizaron en dos condiciones de humedad relativa 50% y 80% H.R. Se siguió la norma ASTM D 3985-02 y se utilizó un analizador de permeabilidad al Oxígeno Systech 8001 (Systech Instruments Ltd., UK) (**Figura 4.3**). El gas utilizado en este caso fue 100% Oxígeno y el área de intercambio utilizada fue de 50 cm² y 5 cm² para los análisis realizados en condiciones de 50% y 80% de humedad relativa, respectivamente.

Los ensayos se realizaron a las películas de Xil/Q con glicerol. Previamente al ensayo, se midió el espesor de la película utilizando un micrómetro y tomando el promedio de 5 medidas. Luego, las películas acondicionadas a 50% HR se colocaron en el equipo y se dejaron estabilizar por aproximadamente 24 hs antes de iniciar la medición.

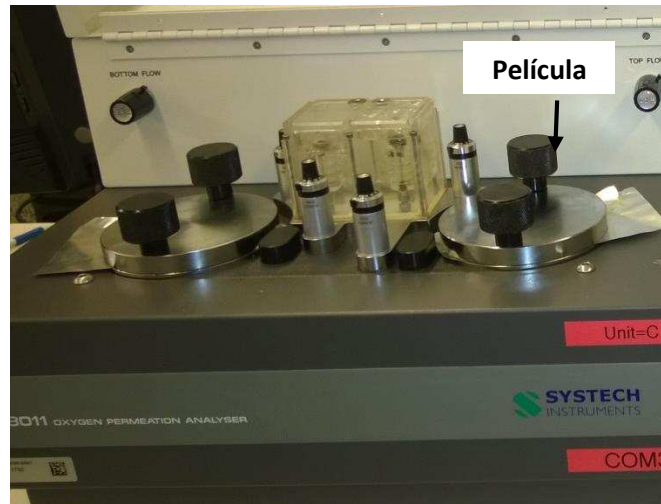


Figura 4.3. Analizador de permeabilidad al Oxígeno Systech 8001.

4.3.4.2. Velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR)

Los ensayos de velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR) fueron realizados según técnicas estándar en condiciones controladas a 50% HR y 23 °C. Se utilizó el método del agua siguiendo la norma ASTM E96-98. Para cada muestra se realizaron tres mediciones.

Se desarrolló un dispositivo de polipropileno que permite determinar de forma gravimétrica la capacidad de permeabilidad al vapor de la película (bajo norma ASTM E96-98) **(Figura 4.4).**

Las películas de Xil/Q se colocaron en la parte superior del dispositivo conteniendo 10mL de agua en su interior (permitiendo un área de intercambio de 39,6 cm²) y se pesó. Luego, se registró el peso cada 30 minutos durante 5 horas y se construyó una curva del peso en función del tiempo. Con el valor de la pendiente obtenida de la recta de ajuste de los puntos experimentales y el área utilizada, se determinó el valor de velocidad de transmisión de vapor de agua. Las mediciones se realizaron por triplicado.



Figura 4.4. Dispositivo para medir la velocidad de transmisión de vapor de agua (ASTM E96-98)

4.3.4.3. Solubilidad

Se evaluó la solubilidad de las películas sumergiéndolas en solución buffer a pH 5,0 durante 24 h. Para ello, las películas acondicionadas a 23°C y 50% HR se cortaron en cuadrados de aproximadamente 1 cm² y se pesaron. Para determinar el contenido de humedad de las muestras (*Peso_{seco}*), se secaron en estufa de vacío a 60°C por 24 h.

Las muestras acondicionadas y cortadas se colocaron en recipientes con solución *buffer* a pH 5,0 (ácido cítrico + fosfato disódico) durante 24 h. Las muestras se retiraron de la solución y el exceso de líquido se eliminó ligeramente presionándolos entre dos secantes. Por último, las películas se secaron al vacío a 60°C durante 24 h y se pesaron (*Peso_{Final}*). Se realizaron cinco determinaciones para cada película. La solubilidad de las películas se calculó utilizando la siguiente **ecuación 4.3**.

$$\text{Solubilidad} = \frac{\text{Peso}_{seco\ inicial} - \text{Peso}_{seco\ final}}{\text{Peso}_{seco\ inicial}} * 100 \quad (\text{Ec. 4.3})$$

4.3.4.4. Propiedades mecánicas

Las películas de Xil/Q fueron caracterizadas mediante el ensayo de resistencia a la tracción en seco y elongación hasta la ruptura, utilizando una máquina de ensayos universal INSTRON 3340, con celda de carga de 1000 N y en condiciones de 23 °C y 50 % HR. Los mismos

se realizaron siguiendo la norma ASTM D882 y se trabajó a una velocidad de 5 mm/min y a una distancia inicial entre las mordazas de 22 mm. Para cada tratamiento, se cortaron 6 muestras en forma de hueso, siguiendo la norma ASTM D1708-9, similar a lo realizado por Pereda y col. (2008) (Figura 4.5).

También se evaluaron las propiedades mecánicas de las películas de Xil/Q sin el agregado de glicerol durante la formación del complejo y las propiedades mecánicas de las películas formadas con presencia de glicerol, pero que luego fueron sumergidas durante 24 hs en *buffer* a pH 5,0 y vueltas a secar.



Figura 4.5. Máquina de ensayo universal INSTRON 3340. Probeta en forma de hueso.

4.3.4.5. Difracción de rayos X (DRX)

Se analizó la estructura cristalina de las películas utilizando difracción de rayos X (DRX). Las mediciones fueron realizadas por personal del PLAPIQUI, Bahía Blanca a través de un servicio técnico especializado. Para el mismo, utilizaron un difractómetro Philips Analytical X-Ray con radiación Cu K α a 45Kv Y 30 Ma. Los difractogramas se obtuvieron en el rango de 5° a 30° (2 θ) a una velocidad de 1,5°/min. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

La película 100%Q, se lavó previo al ensayo para eliminar el exceso de acetato de sodio/ácido acético que fue utilizado para disolver el Q cuando se preparó la solución original.

4.3.4.6. Estabilidad térmica

Las películas se caracterizaron mediante análisis termogravimétrico (TGA). El método consiste en determinar los cambios en la masa de las películas en función del aumento de la temperatura. Se utilizó un TGA/SDTA851 Module (Mettler Toledo).

Se pesaron aproximadamente 5 mg de las películas acondicionadas a 23°C y 50% HR y se sometieron a un calentamiento desde temperatura ambiente hasta 500°C, utilizando una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, bajo corriente inerte de nitrógeno. Las pérdidas de peso en diferentes etapas fueron analizadas. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

4.3.4.7. Efecto de la humedad relativa en el módulo de almacenamiento

Se estudió el efecto de la humedad relativa sobre las propiedades viscoelásticas de las películas de Xil/Q mediante el análisis mecánico dinámico (DMA). La variación del módulo de almacenamiento (E') se determinó utilizando un *TA Instruments* Q800, equipado con un accesorio de humedad externa conectado a la cámara de medición (Kep Technologies Wetsys Setaram Instrumentation).

Para la determinación del efecto de la humedad, se realizaron tres ciclos en los cuales la humedad relativa fue cambiada desde 0% RH a 80 %RH, los cuales se mantuvieron durante 60 minutos a 25°C.

4.3.4.8. Absorción dinámica de vapor (DVS)

La sorción dinámica de vapor (DVS) es una técnica gravimétrica que mide la rapidez y la cantidad de disolvente que absorbe una muestra. Se realiza variando la concentración de vapor que rodea a la muestra y midiendo el cambio en la masa. Principalmente, el vapor de agua es el más utilizado, pero también es posible usar una amplia gama de solventes orgánicos.

Para el análisis en las películas de Xil/Q se utilizó un instrumento dinámico de absorción de vapor de agua (DVS-1, *Surface Measurement Systems*, Reino Unido) para medir

gravimétricamente (con una resolución de $\pm 1 \mu\text{g}$) la absorción y/o pérdida de vapor de agua de las películas cuando la humedad se cambia, manteniendo la temperatura controlada. Estos ensayos fueron realizados por especialistas del centro de Investigación Técnica de Finlandia (VTT).

Para los experimentos, las muestras se cortaron en cuadrados de aproximadamente $1,2 \text{ cm}^2$ y se colocaron en el equipo. Inicialmente las muestras se llevaron a 0% de humedad relativa y luego los cambios en la humedad relativa fueron realizados utilizando la siguiente secuencia: 0-50-75-0 (%) a 23°C . Cada nivel de humedad se mantuvo durante 360 min, por lo tanto, el tiempo total del ensayo fue de 24 h. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

4.3.4.9. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología superficial de las películas de Xil/Q fue estudiada utilizando microscopia electrónica de barrido (SEM). El equipo utilizado fue un Phenom ProX, Phenom-World (Netherlands) con controlador de temperatura que se encuentra en el PRELINE-FIQ-UNL. Las muestras fueron colocadas en rejillas metálicas utilizando cinta adhesiva de doble cara. El análisis se realizó en tres zonas diferentes de las películas.

4.3.4.10. Efecto antimicrobiano

Se evaluó el efecto antimicrobiano de las películas de Xil/Q frente a las bacterias de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* utilizando el método de difusión en agar. Se colocaron discos de film de 20 mm de diámetro en placas de agar que fueron previamente sembradas (superficialmente por técnica “escobillado”) con un volumen de inóculo conteniendo microorganismos indicadores en el intervalo de $10^6 - 10^8 \text{ UFC/mL}$, de acuerdo con Dehnad y col. (2014). Los microorganismos fueron incubados a 37°C por 24 hs. La observación del desarrollo de bacterias se realizó debajo de los films, tanto a ojo desnudo como bajo lupa estereoscópica. Los experimentos se realizaron por duplicado.

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Determinación del grado de ionización del Xil y Q en función del pH

- Determinación de la constante de disociación (pK_a) del xilano

La **Figura 4.6 a)** muestra una de las curvas obtenidas de la titulación potenciométrica del xilano utilizando como titulante NaOH 0,02M.

Antes de llevar a cabo la titulación, la solución de Xil se pasó a través de una resina de intercambio catiónico con el objetivo de que todos los grupos carboxílicos se encuentran no ionizados (en su forma ácida) y que no haya exceso de protones en solución.

A partir de la primera derivada del pH en función del volumen de NaOH agregado (**Figura 4.6.b)** se determinó el volumen correspondiente al punto de equivalencia de la titulación (cuando todos los grupos carboxilos del xilano se encuentran ionizados). Este punto de inflexión se alcanzó cuando se agregaron 3,8 mL de NaOH. Luego, el valor del pK_a del xilano se obtuvo al considerar la mitad de ese volumen, correspondiendo a un pK_a de 3,88. El valor del pK_a obtenido de dos réplicas del ensayo fue de **$3,77 \pm 0,06$** .

No hemos encontrado en bibliografía resultados de un ensayo como este sobre el xilano disuelto, aunque puede señalarse que Laine y col. (1996) mediante titulación potenciométrica de fibras celulósicas provenientes de una pulpa *kraft* no blanqueada de madera de latifoliada (abedul, *Betula verrucosa*) obtuvieron dos tipos de grupos ácidos: uno con un valor de pK_{a1} de 3,3 (correspondiente a los grupos ácidos urónicos del xilano) y el otro con un valor de pK_{a2} de 5,5 (probablemente correspondiente a los grupos carboxílicos de la lignina).

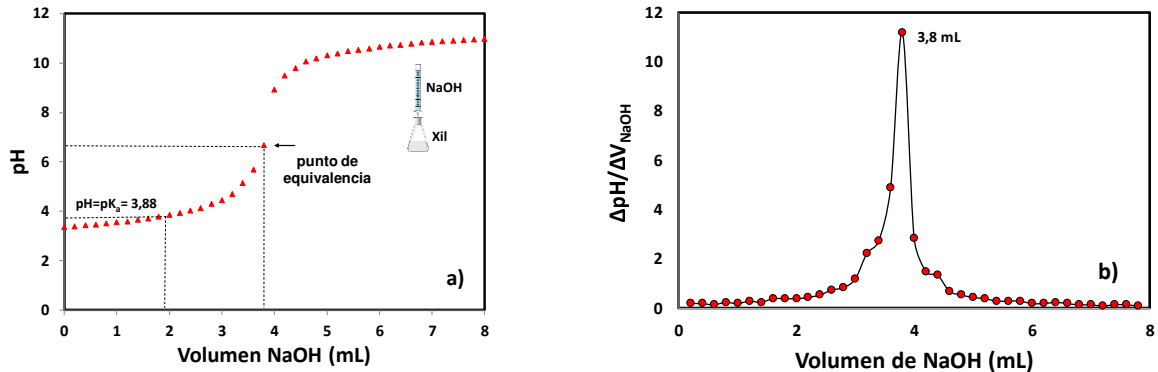


Figura 4.6. a) Titulación potenciométrica del xilano utilizando NaOH 0,02 M (ajustado con fuerza iónica 0,1 N KCl) como titulante, en atmosfera de nitrógeno y bajo continua agitación. El xilano inicialmente se encuentra en su forma no ionizada; **b)** Primera derivada para determinar el volumen correspondiente al punto de equivalencia mediante el punto de inflexión.

- Determinación de la constante de disociación (pK_b) del Q

El pK_b del quitosano se determinó a partir de la curva de titulación potenciométrica que se muestra en la **Figura 4.7 a)**. El primer punto de equivalencia de la curva potenciométrica corresponde a la neutralización del HCl adicionado en exceso y el segundo punto de equivalencia corresponde a la neutralización total de los grupos amina del Q. Ambos puntos de inflexión fueron determinados utilizando la primera derivada del pH en función del volumen adicionado (**Figura 4.7 b)**). Finalmente, el pK_b del quitosano se corresponde con el valor del pH en el punto medio entre los dos puntos de equivalencia (Wang y col. 2011). El valor medio de dos réplicas fue de un pK_b : $6,43 \pm 0,01$, similar a lo informado en bibliografía (Ikeda y col. 1995; Wang y col. 2011).

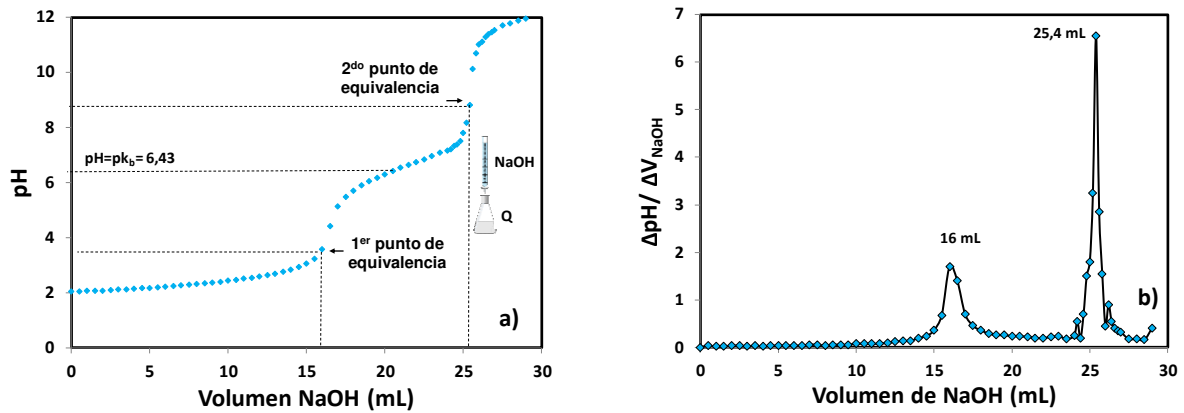


Figura 4.7. a) Titulación potenciométrica del quitosano utilizando NaOH 0,1 M como titulante, bajo atmósfera de nitrógeno y con agitación continua; **b)** primera derivada para determinar los dos volúmenes correspondientes a los puntos de equivalencia.

- Determinación del grado de ionización

La **Figura 4.8** muestra el grado de ionización del xilano y quitosano en función del pH.

Se puede observar en la figura que la intersección entre las curvas ocurre a un valor de pH de 5,15. Este valor indica la máxima interacción que se puede esperar entre los grupos amina del quitosano con los grupos carboxilos de xilano.

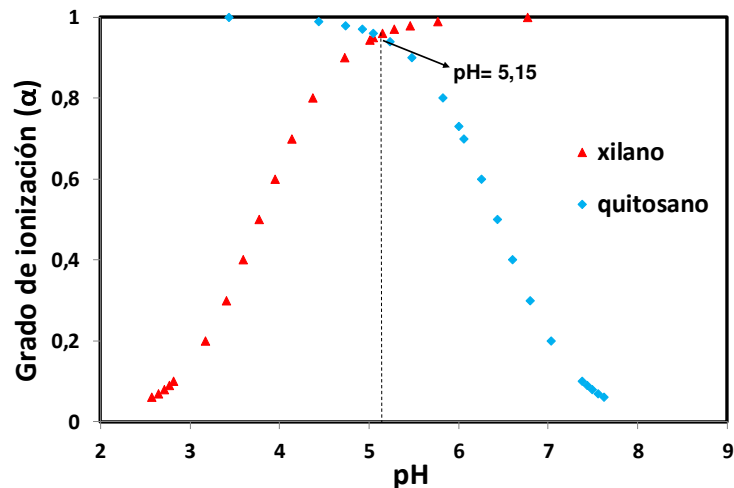


Figura 4.8. Grado de Ionización (α) de los polímeros xilano y quitosano en función del pH.

Por lo tanto, se seleccionó un pH 5,0 para la preparación de las suspensiones de complejos de polielectrolitos de Xil/Q para luego obtener las películas. Se espera que, al pH seleccionado, se maximicen las interacciones electrostáticas entre los grupos carboxilos del xilano y los grupos amina del quitosano, y de esta manera se logre la mayor densidad de interacciones iónicas cuando se obtiene una película.

4.4.2. Monitoreo de la adición de Xil sobre solución de Q a pH 5,0. Selección de las relaciones de masas de Xil/Q específicas

En la **Figura 4.9** se muestra la curva del potencial por flujo de cargas (PFC) obtenida por agregado de cantidades crecientes de solución de Xil (2,5 g/L) a 300 mL de solución de Q (0,06g/L), a pH 5,0 y fuerza iónica 0,03N. En el eje X (*superior*), se muestran las relaciones de masas (g Xil/ g Q) utilizadas durante la titulación, y en el eje X (*inferior*) se muestran las relaciones de cargas (Xil(-)/Q(+)) calculadas considerando las densidades de cargas determinadas previamente por titulación polielectrolítica (Xil: -0,39 meq/g; Q: +4,03 meq/g).

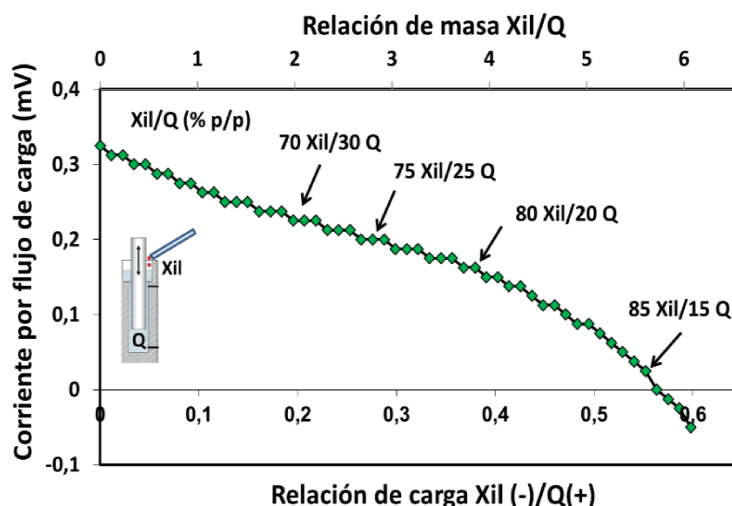


Figura 4.9. Efecto en el potencial por flujo de cargas de la adición de una solución de Xil sobre la solución de Q a pH 5,0 y 0,03 N NaCl. Se indican también las relaciones de masas de Xil/Q (% p/p) seleccionadas para la obtención de películas.

A partir de la **Figura 4.9** se seleccionaron cuatro diferentes relaciones de masas Xil/Q para preparar las películas. La selección se realizó teniendo en cuenta que se buscaba obtener películas homogéneas a partir de suspensiones estables (con exceso de carga catiónica libre) que contengan altas cantidades de xilano. Las relaciones de masas (Xil/Q (%p/p)) seleccionadas fueron: 70/30, 75/25, 80/20 y 85/15. Luego, los CatPECs obtenidos fueron caracterizados mediante determinaciones de densidad de carga y tamaño promedio de partículas.

4.4.3. Caracterización de los complejos de polielectrolitos a las diferentes relaciones de masa

4.4.3.1. Determinación de la densidad de carga por titulación polielectrolítica

En la **Figura 4.10** se muestran los resultados de las densidades de cargas obtenidos mediante titulación polielectrolítica de los PECs preparados a las distintas relaciones de masa de Xil/Q seleccionadas. Para todos los PECs el titulante utilizado fue la solución estándar de PVSK (200 μ N).

Los resultados muestran que todos los complejos de polielectrolitos preparados son catiónicos (CatPECs) y presentan baja densidad de carga. Teniendo en cuenta las densidades de carga de los polielectrolitos individuales determinadas previamente (Xil: -0,39 meq/g; Q: +4,03 meq/g), todos los CatPECs mostraron densidades de carga inferiores a las esperadas, probablemente debido a las desviaciones de la estequiometría 1:1 (ya observadas) durante la obtención del complejo y durante la titulación con PVSK. No obstante, estos resultados son útiles para caracterizar la carga del sistema. La **Figura 4.10** también muestra que con cantidades crecientes de Xil, la densidad de carga de los CatPECs disminuyó, lo cual era de esperar y coincide con lo obtenido en la curva de corriente de flujo (**Figura 4.9**).

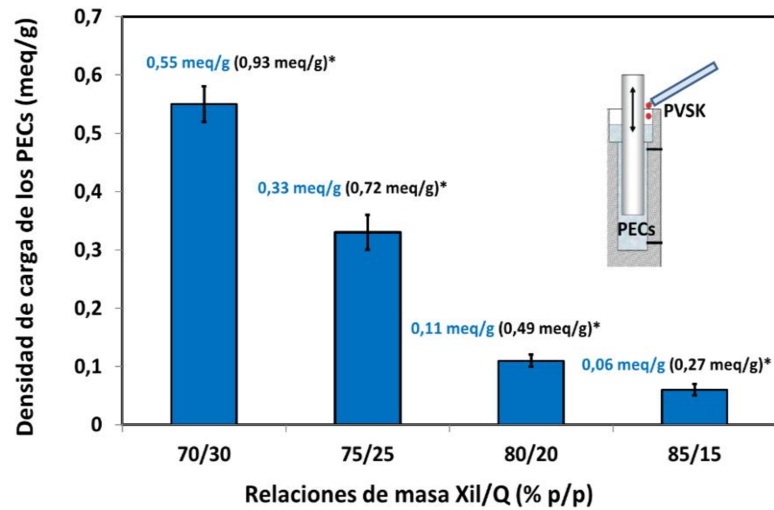


Figura 4.10. Densidad de carga de los PECs catiónicos preparados a diferentes relaciones de masa Xil/Q (%p/p) (70/30, 75/25, 80/20, 85/15) a pH 5,0 y 0,03 M de fuerza iónica. Se utilizó PVSK 200 μ N como titulante. (*) Se muestran las densidades de carga calculadas a partir de las relaciones de masas y las densidades de cargas de los PE determinadas previamente por titulación polielectrolítica (Xil: -0,39 meq/g; Q: +4,03 meq/g).

4.4.3.2. Determinación del tamaño de partícula promedio por dispersión de luz dinámica (DLS)

En la **Tabla 4.1** se muestran los resultados del tamaño de partícula promedio y los índices de polidispersidad de los PECs preparados a las distintas relaciones de masa de Xil/Q (%p/p) seguido de homogeneización utilizando un homogeneizador ultrasónico. Se utilizó para ello la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS).

La tabla muestra una distribución monomodal del tamaño de partícula con un valor promedio de 490 nm para una relación de masa de 70/30, mientras que se muestra una distribución bimodal para una relación de masa de 75/25, es decir para los PECs con mayor contenido de Xil y con menor densidad de carga. En este último caso, las partículas presentes de mayor tamaño indican que se formaron algunos agregados. Para las relaciones de masa de 80/20 y 85/15 de Xil/Q no se pudieron realizar las mediciones debido a que se obtuvieron complejos inestables y se observó un coacervado.

Tabla 4.1. Tamaño de partícula promedio e índice de polidispersidad (PDI) de los diferentes complejos preparados a pH 5,0 y 0,03 M de fuerza iónica.

Xil/Q (% p/p)	Promedio de tamaño de partícula ^(a) (nm)	PDI
70/30	492 ± 44 (100%)	0,17
75/25	663 ± 81 (84%) 4447 ± 583 (16%)	0,21
80/20	(b)	(b)
85/15	(b)	(b)

^(a) La curva de distribución de tamaño de partícula (PSD) ponderando según la intensidad de dispersión de cada fracción o familia de partículas, se utilizó para informar el tamaño de cada pico, y la curva de distribución de tamaño de partícula ponderado (PSD) según el volumen se utilizó para informar las cantidades relativas de cada pico en la distribución (de acuerdo con las instrucciones del equipo). Se indican las desviaciones estándar de los promedios de seis réplicas del ensayo. ^(b) Valores que no se pudieron determinar usando DLS.

Hemos encontrado que la homogeneización (u otro mecanismo de dispersión) es un paso clave para luego obtener películas homogéneas. Si se comparan los tamaños de partículas obtenidos luego de homogeneizar la muestra Xil/Q (70/30 (% p/p) (\approx 500 nm) con los obtenidos utilizando soluciones iniciales de Xil y Q más diluidas (\approx 400 nm) (capítulo 3) para la misma relación de masa y sin homogeneizar, se puede observar que en este caso el tamaño de partícula fue aproximadamente un 25% mayor. Esto puede ser aún más crítico si se utilizaran soluciones iniciales más concentradas de Xil y Q.

La **Figura 4.11** muestra las gráficas de intensidad (%) en función del tamaño de partícula para los PECs preparados con la relación de masa 70 Xil/30 Q (%p/p) sin homogeneizar y seguido de homogeneización ultrasónica. Para el primer caso, las mediciones mostraron una distribución bimodal y un PDI mayor (0,48) y con escasa repetitividad entre las mediciones.

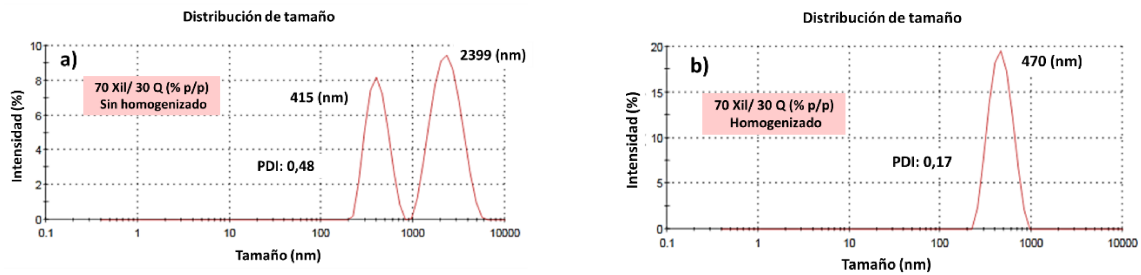


Figura 4.11. Curvas de distribución de tamaño obtenidas mediante dispersión de luz dinámica (Nanozetasizer SZ90) para los PECs de Xil/ Q obtenidos con una relación de masa de 70/30 (%p/p): **a)** sin homogeneizar; **b)** homogeneizado.

4.4.4. Películas de Xil/Q obtenidas

Las concentraciones finales de las suspensiones de PECs formados para la preparación de las películas estuvieron en el rango entre: 3,46 g PECs/L cuando se prepararon PECs 70 Xil/30 Q (%p/p) y 3,67 g PECs/L cuando se prepararon PECs 85 Xil/15 Q (%p/p). Teniendo en cuenta el tamaño de los moldes, se tomó un volumen de esas soluciones de PECs tal que permita obtener una película con un gramaje de 50 g/m².

La **Figura 4.12** muestra los moldes de silicona luego de evaporar a 40°C y de forma parcial el agua de las suspensiones de Xil/Q preparados con diferentes relaciones de masa Xil/Q. Cuando se utilizaron relaciones de masas con alto contenido de xilano, Xil/Q: 80/20 y 85/15, se pueden observar precipitados y películas no homogéneas.

Particularmente, las **Figuras 4.12 a) y b)** muestran que al evaporar de forma parcial el agua de las suspensiones de los PECs, puede observarse en un momento la formación de un “gel” homogéneo. Puede pensarse que el mecanismo propuesto para la formación de películas continuas desde partículas poliméricas (Felton 2013) o desde látex (Winnik 1997) es aplicable a nuestro sistema.



a) 70 Xil / 30 Q (%p/p)



b) 75 Xil / 25 Q (%p/p)



c) 80 Xil / 20 Q (%p/p)



d) 85 Xil / 15 Q (%p/p)

Figura 4.12. Obtención de las películas por evaporación de las suspensiones de Xil/Q con diferentes relaciones de masa y con 10% p/p de plastificante: a) 70/30; b) 75/25; c) 80/20; d) 85/15 Xil/Q (%p/p).

4.4.4.1. Mecanismo propuesto de formación de la película

En la **Figura 4.13** se observan las tres principales etapas propuestas por Felton (2013) para el mecanismo de formación de películas a partir de partículas poliméricas. Inicialmente las partículas, en nuestro caso los PECs, se encuentran dispersos (situación A) y luego por evaporación parcial del agua, toman contacto entre ellos por aumento de la concentración (situación B). Seguidamente, los PECs deben deformarse para rellenar los espacios vacíos generados por la continua evaporación del agua, generando un mayor nivel de contacto entre

ellos. Esta deformación puede estar condicionada por un nivel mínimo de temperatura (*minimum film forming temperature MFFT*). Continuando con el secado continuo, el proceso avanza con la coalescencia de las partículas por interdifusión de las cadenas poliméricas (situación C).

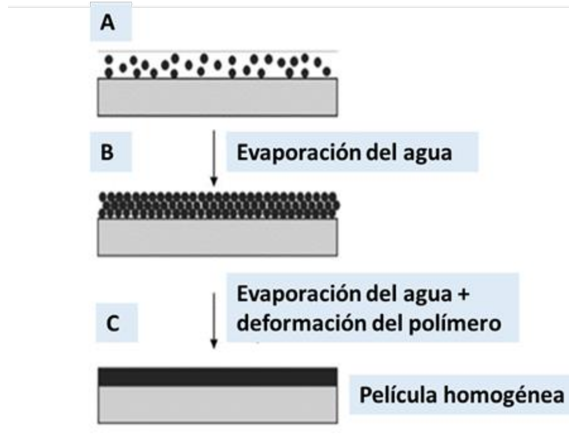


Figura 4.13. Esquema indicado por Felton (2013) para explicar las principales etapas de la formación de películas desde partículas poliméricas.

En la **Figura 4.14** se puede observar que la película obtenida por secado de una suspensión de PECs de Xil/Q con una relación de masa 70/30 presentó una muy buena formación. En relación al mecanismo de formación de películas a partir de polímeros o látex tenemos las siguientes particularidades que facilitan al mismo:

- a) Los complejos se encuentran fuertemente hidratados, permitiendo que los mismos se comporten como partículas flexibles.
- b) La temperatura mínima de formación de películas (MFT) estaría por debajo de las temperaturas de secado empleada en este trabajo.
- c) La interdifusión de las cadenas poliméricas es muy probable ya que es de esperar que los complejos presenten cadenas poliméricas externas libres.
- d) La interdifusión además, puede estar facilitada por la existencia de cargas libres (no compensadas) en el interior de los complejos, según lo indicado por las desviaciones de la estequiometría que tienen lugar en la formación de los complejos de Xil/Q.



Figura 4.14. Película obtenida a partir de una suspensión de complejos de Xil/Q formados a pH 5,0 y 0,03 NaCl, utilizando una relación de masa de 70 Xil/30 Q (%p/p).

4.4.5. Caracterización de las películas

4.4.5.1. Propiedades de barrera a los gases (vapor de agua y oxígeno)

La velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR) de las películas de Xil/Q con diferentes relaciones de masa y con 10% p/p de glicerol se midió a 50% de HR, mientras que la permeabilidad al oxígeno (OP) se midió en dos condiciones de humedad a 50% HR y a 80% HR. De acuerdo con la **Tabla 4.2**, todas las películas mostraron resultados moderados de WVTR y bajo OP a 50% de RH. Se puede observar que los mejores valores de OP al 50% RH se obtuvieron con las películas que poseen mayor porcentaje de Xil. Como es sugerido en la bibliografía para las películas con alto contenido de hemicelulosas, este comportamiento se podría atribuir a los enlaces puente hidrógeno que forman una estrecha red entre las cadenas de xilano, los cuales contribuyen a un buen empaque del material y permiten de esta manera obtener buenas propiedades de barrera.

Los valores obtenidos de OP al 50% RH para las películas con una relación de masa Xil/Q de 70/30 y 75/25 (0,265 y 0,13 $\text{cm}^3\mu\text{m}/\text{m}^2\text{día kPa}$, respectivamente), se encuentran en el mismo orden que los valores informados de películas poliméricas sintéticas de etilen-vinil alcohol (EVOH), utilizadas comercialmente: Hansen y Plackett (2008) informaron valores de OP de 0,3 $\text{cm}^3\mu\text{m}/\text{m}^2\text{día kPa}$, a 23°C y 50% HR para películas de EVOH.

Por otro lado, Luo y col. (2014) evaluaron la permeabilidad al oxígeno de películas formadas con 100% de Q y sumergidas en una solución de Xil al 3% p/v y obtuvieron un valor de

7,3 cm³ μm/m² día kPa (al 0% de HR y a 23°C). En comparación con estos resultados, las películas obtenidas en este trabajo mostraron mejores propiedades de barrera al oxígeno, siendo incluso mayor la HR de evaluación (50% de HR).

La tabla también muestra que la OP de las películas de Xil/Q se incrementó en cuatro 0 mas órdenes de magnitud cuando la humedad relativa aumentó de 50% a 80% RH, lo que indica que estas películas son altamente sensibles a estos cambios. Estos resultados eran de esperar, considerando que tanto el Xil como el Q, son polímeros hidrofílicos (Mikkonen y Tenkanen 2012), debido principalmente a su alto contenido de grupos hidroxilos. Las películas de EVOH también son altamente sensibles a la humedad, y por lo tanto sus propiedades de barrera son afectadas en ambientes de alta HR (Faisant y col. 1998).

Tabla 4.2. Velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR) y permeabilidad al oxígeno (OP) de las películas medidas a 23 °C y 50% HR, y a 80% HR.

Xil/Q (% p/p)	WVTR ^(a) (50% RH) (g/h m ²)	OP (50% HR) ^(b) (μm cm ³ /día m ² kPa)	OP (80% HR) ^(b) (μm cm ³ /día m ² kPa)
70/30	21,3 ± 0,8	0,265 ± 0,001	626 ± 29
75/25	21,1 ± 1,9	0,133 ± 0,07	556 ± 21
80/20	18,9 ± 1,3	0,054 ± 0,02	551 ± 19
85/15	19,6 ± 0,3	< 0,01	311 ± 1

^(a) Desviación estándar del promedio de tres réplicas.

^(b) Desviación estándar del promedio de dos réplicas.

Se puede observar en la **Figura 4.15** que las películas de Xil/Q presentan mayor permeabilidad al vapor de agua que las películas sintéticas reportadas por Aulin y Lindström (2011). No obstante, las películas de Xil/Q son las que presentan la menor permeabilidad al oxígeno en condiciones de 50% HR y a 23°C.

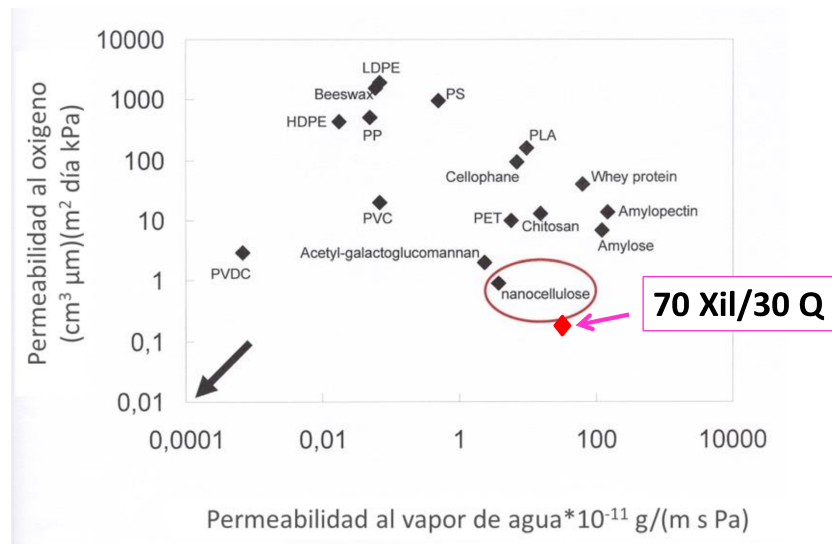


Figura 4.15. Permeabilidad al oxígeno en función de la permeabilidad al vapor de agua de películas sintéticas convencionales y películas naturales. La permeabilidad al oxígeno fue determinada en condiciones de 50% HR y a 23 °C. (Extraído de: Aulin y Lindström 2011. (LDPE: polietileno de baja densidad; HDPE: polietileno de alta densidad; Beeswax: cera de abejas; PP: poli (propileno); PVDC: poli (cloruro de vinilideno); PVC: poli (cloruro de vinilo); PLA: poli (ácido láctico); PET: poli (etilen tereftalato).

4.4.5.2. Solubilidad

La **Tabla 4.3** muestra los valores de solubilidad luego de sumergir las películas de Xil/Q en *buffer* pH: 5,0 durante 24 h y también muestra el porcentaje calculado de acetato de sodio / ácido acético, cloruro de sodio y glicerol presentes en las películas antes de la inmersión.

Los valores de solubilidad obtenidos para las películas fueron relativamente altos (26,5-35,4%). Teniendo en cuenta el contenido (%) de los compuestos inorgánicos y plastificantes presentes en la película antes de la inmersión en dicha solución, los valores coinciden con los resultados de solubilidad obtenidos. Por lo tanto, se podría sugerir que estos compuestos se disolvieron en la solución *buffer*. Sin embargo, todas las películas de Xil/Q mantuvieron su integridad luego de las 24 h de inmersión.

La tabla también muestra que el aumento de la cantidad de Q en las películas dio como resultado un aumento en los valores de solubilidad. Según el test de ANOVA de una vía hay diferencia significativa entre los valores de solubilidad de las diferentes películas ($p=0,013 < 0,05$), precisamente la solubilidad de la película con una relación de masa 85/15 difiere del resto de las

películas. Estos valores de solubilidad están en el mismo orden que los obtenidos por otros autores utilizando también polímeros naturales. Particularmente, Wang y col. (2014) obtuvieron porcentajes de solubilidad aún mayores (35%-50%) por inmersión en agua de películas compuestas de alcohol polivinílico/xilano y utilizando ácido cítrico como plastificante, evaluado a 23 °C y durante 24 horas.

La solubilidad es una propiedad importante para caracterizar las películas. En el caso de películas comestibles, la alta solubilidad en agua es beneficiosa; pero para aplicaciones como el envasado, se requiere una baja solubilidad en agua para mantener la integridad del producto a lo largo del tiempo (Goksu y col. 2007).

Tabla 4.3. Valores de solubilidad de las películas a 23 °C, pH 5,0 durante 24 h y los porcentajes de compuestos inorgánicos y plastificantes presentes en las películas.

Xil/Q (% p/p)	Solubilidad (%) ^{a)}	Contenido de acetato de sodio, NaCl y glicerol en la película (%)
85/15	26,5 ± 1,6	29,3
80/20	33,4 ± 6,8	31,8
75/25	35,4 ± 2,2	34,2
70/30	33,2 ± 1,4	36,3

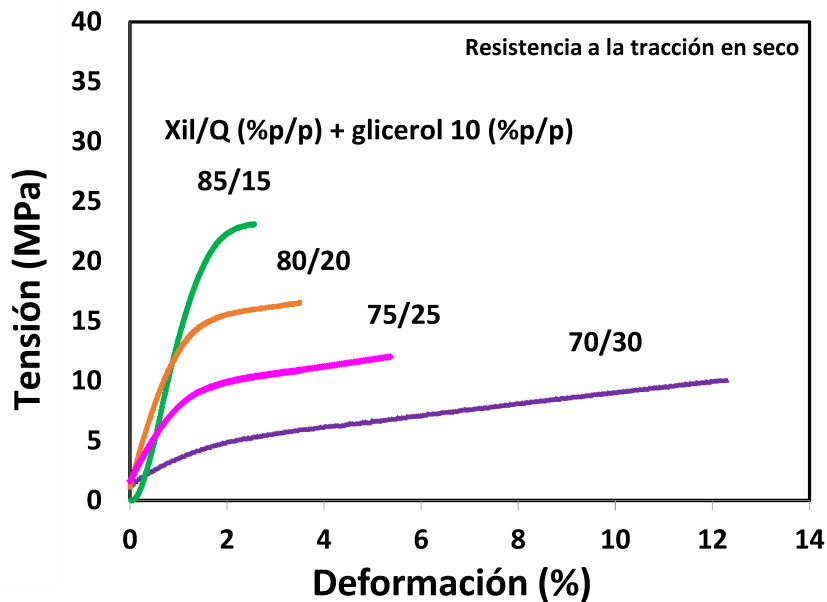
^{a)} Desviación estándar del promedio de cinco réplicas.

4.4.5.3. Propiedades mecánicas de las películas. Efecto del glicerol

Las Figuras 4.16 a y b) muestran las curvas de Tensión (MPa) – Deformación (%) de las películas de Xil/Q con glicerol antes y después de sumergirlas durante 24 h en *buffer* a pH 5,0 y secadas bajo tensión. En la figura 4.16 a) se puede observar que cantidades crecientes de Q (15% - 30% en la película) dieron como resultado una disminución en la resistencia a la tracción (de 23 MPa a 10 MPa), pero se logró un aumento significativo en la deformación a la rotura de las películas, alcanzando hasta un valor del 12% para el caso de la película con una relación de masa 70/30 % de Xil/Q.

Al disminuir la cantidad de Xil en las películas, los enlaces de hidrógeno intermoleculares y la cristalinidad de la película disminuyeron notablemente, como se muestra luego en los resultados de DRX. Como consecuencia de esto, las películas con menor porcentaje de Xil presentan una menor resistencia a la rotura, pero una mayor deformación. Valores similares fueron obtenidos por otros autores utilizando polímeros naturales. Kayserilioglu y col. (2003) combinaron el xilano con otro polímero, el gluten de trigo. Estos autores mostraron que las películas formadas con un 40% de xilano y un 60% de gluten de trigo a pH 11,0, presentaron valores aceptables de resistencia a la tracción (9 MPa) y de elongación a la rotura (9,5%).

Si comparamos las propiedades mecánicas que se muestran en la **Tabla 4.5** reportadas por Bastarrachea y col. (2011) para las películas comúnmente utilizadas en el envasado de alimentos, las películas de Xil/Q obtenidas en este trabajo, muestran valores de resistencia a la tracción similares a las de LDPE (polietileno de baja densidad), las cuales presentan una resistencia a la tracción entre 7-25 MPa. Además, las películas de Xil/Q presentan mayores valores de deformación que las películas de PS (poliestireno) (del 2-3%).



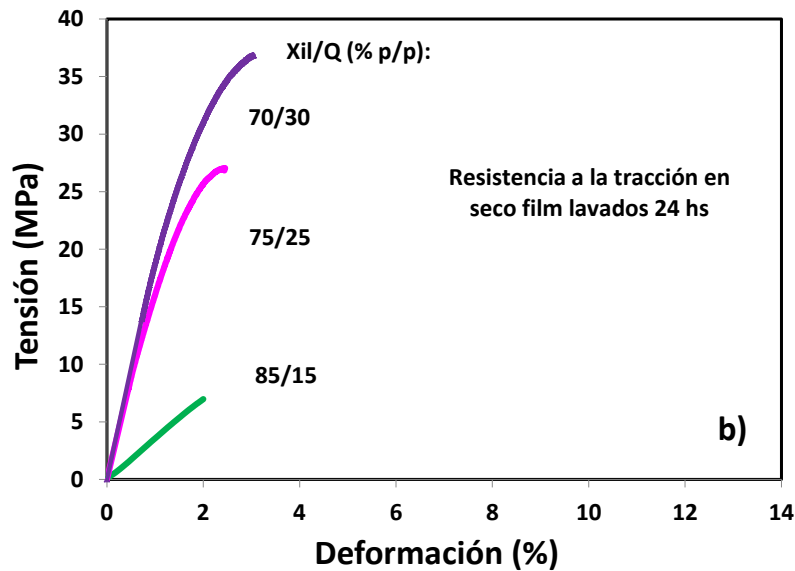


Figura 4.16. Curva de Tensión (MPa) – Deformación (%) (a) antes y (b) después de sumergirlas en solución buffer a pH 5.0 durante 24 h y secadas nuevamente. Las propiedades se midieron a 23°C y a 50% de HR. Los espesores de las películas se encontraron entre 60 μm (Xil/Q: 70/30; 75/25) y 120 μm (Xil/Q: 80/20; 85/25).

Tabla 4.5. Propiedades mecánicas de los materiales comúnmente utilizados para el embalaje de alimentos en condiciones de 65% HR y 20-25 °C. (Bastarrachea y col. 2011)

Material	Resistencia a la tracción (MPa)	Deformación (%)
Polietileno de baja densidad (LDPE)	7-25	300-900
Polietileno de alta densidad (HDPE)	19-31	20-50
Poli (propileno) (PP)	27-98	200-10000
Poli (etilen tereftalato) (PET)	157-177	70
Poli (estireno) (PS)	31-49	2-3
Poli (alcohol vinílico) (PVOH)	39-118	225
Poli (cloruro de vinilo) (PVC)	42-55	20-180
Poli (etilen-co-vinil alcohol) (EVOH)	55-65	100-225

Luego de sumergir las películas en solución *buffer* a pH 5,0 durante 24 h y volverlas a secar bajo tensión, las deformaciones de todas las películas disminuyeron significativamente y la resistencia a la tracción aumentó (**Figura 4.16 b**) debido a que el plastificante se solubilizó en el medio líquido. Los resultados también muestran que la respuesta a la resistencia a la tracción de

las películas sumergidas, en relación a los porcentajes de masa de cada polímero, se opone a la de las películas sin previa inmersión en solución *buffer* (**Figura 4.16 a**). Una posible explicación es que los PECs, en particular las cadenas hidrofílicas de Q en exceso conteniendo cargas catiónicas libres, se hinchan durante la inmersión de las películas en solución *buffer*. Cuando las películas se vuelven a secar, pero en este caso en ausencia de glicerol, se produce una reorganización de las cadenas de Q, con la posible formación de nuevos enlaces que generen un aumento en la resistencia a la tracción de las películas.

En la **Figura 4.17** se muestran las curvas de Tensión (MPa) – Deformación (%) de las películas formadas a partir de los complejos de Xil/Q, pero sin la adición de plastificante. Se puede observar que las curvas presentan el mismo comportamiento que las películas sumergidas en *buffer* a pH=5,0 y secadas bajo tensión (**Figura 4.16 b**). Los valores de deformación son similares, pero los valores en la resistencia a la tracción alcanzados fueron menores.

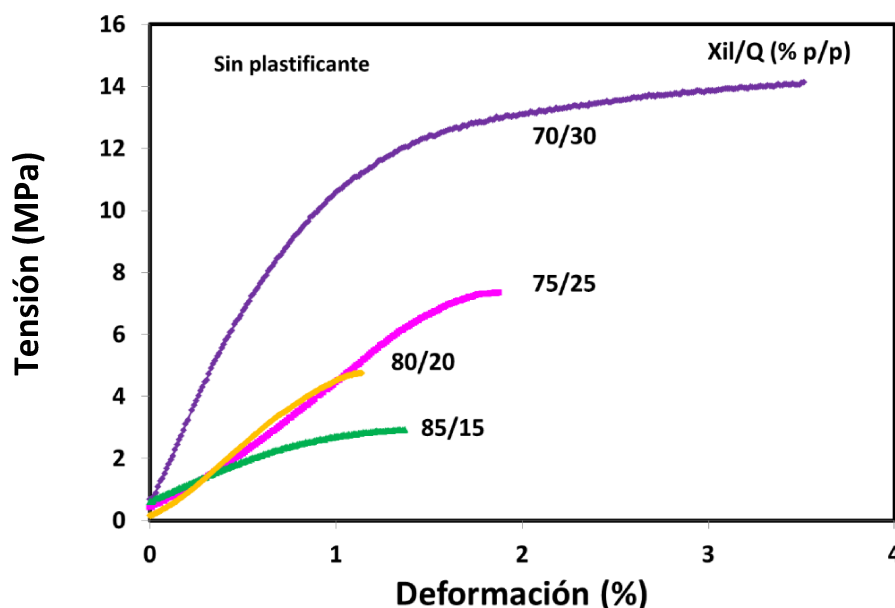


Figura 4.17. Curva de de Tensión (MPa) – Deformación (%) de las películas de Xil/Q preparadas a las distintas relaciones de masa (70/30, 75/25, 80/20, 85/15) y sin plastificante.

Las películas de referencia de Xil (100/0) y de Q (0/100) preparadas a pH 5,0 y con un 10% en peso de glicerol, también se consideraron para la evaluación de propiedades mecánicas.

Las películas de referencia de Q no pudieron ensayarse debido a que cuando se las retiró de los moldes de silicona (tensionadas) y se las colocó en un ambiente a 23 °C y 50% HR comenzaron a deformarse con el tiempo, se volvieron opacas y rígidas (**Figura 4.18 a**). Otros autores han informado una buena formación de las películas de Q (Kaaraslan y col. 2010; Kim y col. 2006), sin embargo, en la mayoría de los casos, el procesamiento de Q fue radicalmente diferente de la metodología descrita en este trabajo. Particularmente, Kaaraslan y col. (2010) para la obtención de las películas disolvió el Q en mayores cantidades de ácido acético (2% p/v) y no modificó el pH final, es decir que se encontraban en condiciones más ácidas que a pH 5,0 como es nuestro caso. Por otro lado, las películas de Xil (100/0) fueron demasiado quebradizas y frágiles para ser sometidas a pruebas mecánicas (**Figura 4.18 b**), coincidiendo con las observaciones informadas por otros autores (Gröndahl y col. 2004).

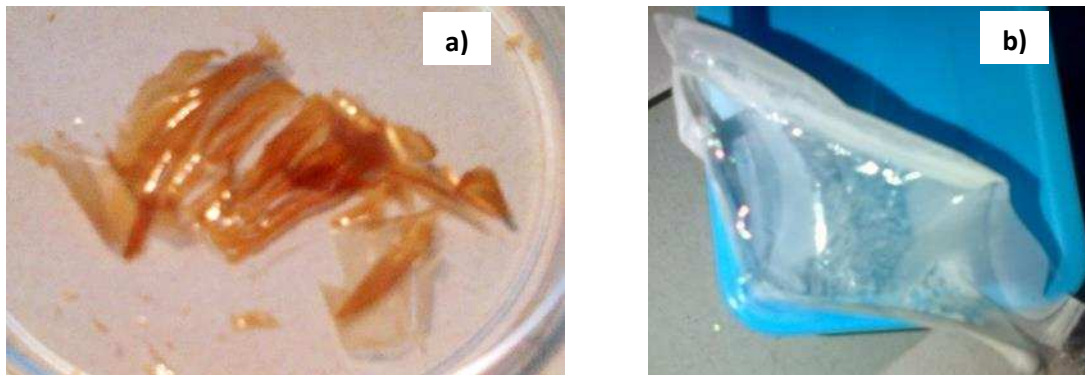


Figura 4.18. Películas obtenidas a pH 5,0 y con 10% (p/p) de glicerol (a) Xil (100/0) y (b) Q (0/100).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las propiedades mecánicas, la película con una relación de 70/30, se seleccionó para una caracterización más detallada. Para fines de comparación, las películas preparadas con el mayor contenido de Xil (85/15) también se caracterizaron.

4.4.5.4. Difracción de rayos X

La **Figura 4.19** muestra los difractogramas obtenidos de las películas de Xil (100/0), y de Xil/Q (70/30 y 85/15) (% p/p). Las películas de Q (0/100) fueron lavadas durante 24 h en solución *buffer* pH 5,0.

Para la película de Xil (100/0) se puede observar la presencia de cinco picos cristalinos distintivos en $2\theta = 10,9^\circ$; $12,4^\circ$; $19,2^\circ$; $22,6^\circ$ y $25,2^\circ$, donde los dos picos principales se encuentran en $2\theta = 19,2^\circ$ y $2\theta = 22,6^\circ$. Estos resultados son similares a los publicados anteriormente por Horio e Imamura (1964) para películas de xilano de madera de haya, quienes obtuvieron cuatro picos cristalinos levemente corridos a mayores valores en 2θ : $11,2^\circ$; $12,6^\circ$; $19,4^\circ$; $22,6^\circ$

Según Šimkovic y col. (2014) y Horio e Imamura (1964), al aumentar el contenido de grupos ácidos 4-O-metil-D-glucurónico en el xilano, la intensidad de los picos cristalinos puede disminuir y también se pueden detectar leves cambios en el difractograma.

Por otro lado, Peng y col. (2011) observaron dos picos principales en el patrón de DRX para las películas de xilano aisladas de holocelulosa de bambú pero a $2\theta = 18^\circ$ y $2\theta = 22,7^\circ$. Sugirieron que estos picos podrían atribuirse a la reorganización y asociación (por ejemplo, enlaces de hidrógeno) de las cadenas de xilano durante la formación de la película, dando como resultado regiones cristalinas en la misma.

Para la película de Q solo se puede observar la presencia de dos picos cristalinos distintivos en $2\theta = 11,9^\circ$ y a 19° , al igual que lo reportado por otros autores (Ritthidej y col. 2002).

Los difractogramas de las películas de Xil/Q muestran que la formación de PECs redujo la cristalinidad respecto a la película conteniendo 100% de Xil (100/0). Al aumentar la cantidad de Q presente en las películas se observan picos más anchos y de menor intensidad. Otros autores observaron un comportamiento similar en sistemas análogos (Gabrielii y col. 2000; Karaaslan y col. 2010). En particular, la película preparada a una relación de masa de 70 Xil/30

Q (%p/p) mostró los picos más anchos, sugiriendo que la tendencia a cristalizar del xilano es reducida pero no eliminada totalmente.

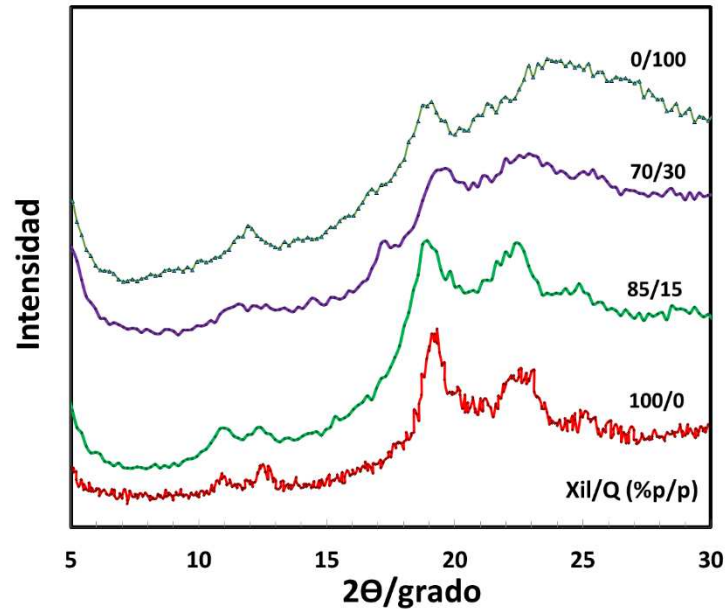


Figura 4.19. Diffractogramas de las películas de Xil (100/0), de Q (0/100) y de las películas de Xil/Q con diferentes relaciones de masa (70/30; 85/15), lavadas en buffer pH 5,0 durante 24 h.

4.4.5.5. Estabilidad Térmica

El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó para las películas de Xil (100/0) y Q (0/100) y para las películas de Xil/Q con diferentes relaciones de masa (85/15 y 70/30) y con plastificante. Las curvas de pérdida de masa (TGA) y las curvas de la derivada de la pérdida de masa (DTG) en función de la temperatura se muestran en la **Figura 4.20** y **Figura 4.21**, respectivamente.

El comportamiento térmico observado para estas películas se puede describir en dos etapas principales: una primera pérdida de masa correspondiente al agua y componentes de bajo peso molecular, y una segunda pérdida de masa que se puede adjudicar a la degradación parcial de los polímeros.

Para la película de Xil puro (100/0), la pérdida de peso inicial fue del $9,4\% \pm 0,81\%$ y se produjo en un rango de temperatura entre $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $136\text{ }^{\circ}\text{C}$. La degradación del polímero tuvo lugar

entre 188 ° C - 380 ° C con dos velocidades máximas de pérdida a 235 ° C y 299 ° C (**Figura 4.21**).

Para la película de Q puro (0/100) se observa una velocidad de degradación máxima a 258 ° C.

Para las películas con una relación de masa de 85/15 % Xil/Q, la pérdida de peso asociada a la evaporación del agua fue similar a la de las películas de Xil (100/0) (10,9% ± 3,4%). Sin embargo, las películas con una relación de masa del 70 Xil/30 Q (%p/p) exhibieron una pérdida de agua mayor (18,9% ± 4,70%). Este comportamiento podría explicarse por el hecho de que los materiales amorfos tienen una mayor capacidad de retención de agua que los materiales con regiones cristalinas (Stefanescu y col. 2012). La pérdida de masa debido a la degradación de la película con un 85 Xil/15 Q (%p/p) también presentó dos velocidades máximas de degradación (T_{max} 265 ° C y 280 ° C) (**Figura 4.21**). Mientras que, se observó una sola velocidad máxima para la degradación de la película con una relación de masa del 70/30 % (T_{max} 270 ° C). Stefanescu y col. (2012) afirmaron que la presencia de una sola velocidad máxima en la degradación es indicativa de películas homogéneas.

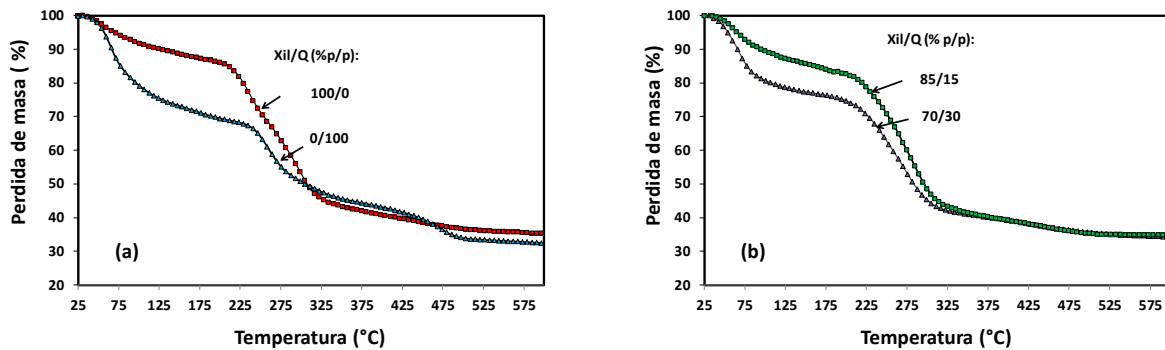


Figura 4.20. Curvas TGA de las películas de **a)** Xil (100/0) y Q (0/100) y **b)** de las películas de Xil/ Q con diferentes proporciones de masa de (85/15, 70/30) y con un 10% en peso de glicerol.

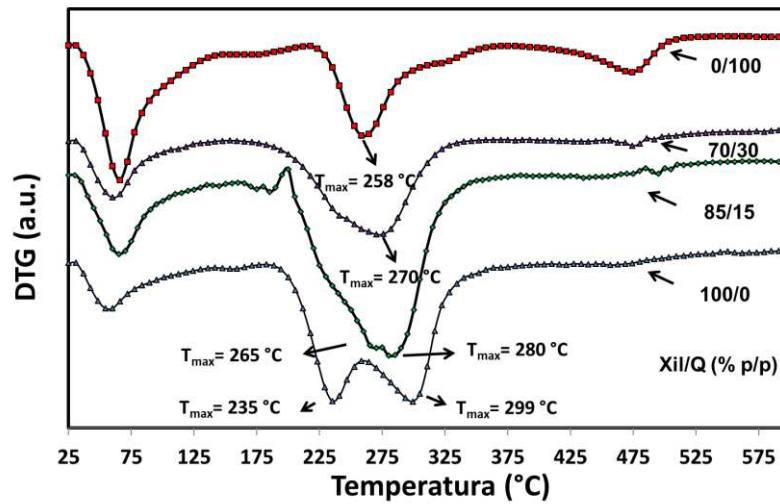


Figura 4.21. Curvas DTG de las películas de Xil (100/0) y Q (0/100) y de las películas Xil/Q con diferentes proporciones de masa (85/15, 70/30) y con un 10% en peso de glicerol.

4.4.5.6. Efecto de la humedad relativa en el módulo de almacenaje

El efecto de la humedad relativa en las propiedades viscoelásticas de las películas con una relación de masa de 70 Xil/30 Q (% p/p) y de 85 Xil/15 Q (%p/p) se estudiaron mediante análisis mecánico dinámico (DMA).

En la **Figura 4.22** se muestra el módulo de almacenamiento (E') en función del tiempo cuando la humedad relativa se cambió sucesivamente de 0% a 80% HR de forma cíclica cada 60 minutos.

Los resultados muestran que los módulos de almacenamiento (E') de ambas películas fueron similares y altamente dependientes de las condiciones ambientales. En condiciones de 0% RH, los valores de E' se encontraron entre 208 - 230 MPa para ambas películas. Mientras que, cuando la HR se incrementó a 80% HR, el E' de las películas exhibió una fuerte disminución hacia valores cercanos a cero, indicando la pérdida del almacenamiento de la energía y el aumento de la viscosidad del material.

De acuerdo con estos resultados las condiciones de HR altas afecta el rendimiento mecánico de las películas, ya que las moléculas de agua actúan como plastificante del material. Favorablemente, el E' se recupera por completo cuando la humedad se reduce a 0% de HR

después de cada ciclo de 0-80% de HR, lo que sugiere que las películas pueden soportar condiciones de alta humedad sin sufrir cambios irreversibles.

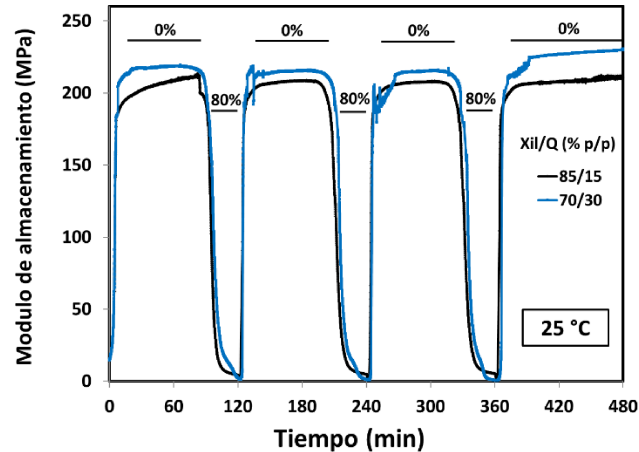


Figura 4.22. Módulo de almacenamiento de las películas de Xil/Q con diferentes relaciones de masa (85 Xil/15 Q (%p/p) y 70 Xil/30 Q (%p/p) en función del tiempo en que la humedad relativa se cambió continuamente de 0% a 80% HR.

4.4.5.7. Sorción de vapor dinámica

La **Figura 4.23** muestra el contenido de agua en equilibrio de las películas de Xil/Q con diferentes relaciones de masa Xil/Q (% p/p) (70/30, 75/25, 80/20 y 85/15) cuando se modificó la humedad relativa desde 0% a 50%, luego a 75% y por último nuevamente a 0%. Para estos experimentos, no fue posible seleccionar condiciones de humedad del 80% HR, debido a que, en las mismas la película se deformaba y se adhería al soporte, pudiendo conducir a errores en las determinaciones.

Inicialmente todas las películas fueron acondicionadas a 0% HR y a 23 °C. Los contenidos de agua (%) se calcularon utilizando como valores de masa iniciales medidos a 0% de HR. Luego la humedad relativa se aumentó a 50% RH. Se puede observar que para todas las películas el contenido de agua aumentó. Particularmente la película con mayor contenido de Xil (85 Xil/15 Q (%p/p)) fue la que presentó un menor contenido de agua.

Cuando la humedad relativa se incrementó al 75% HR, el contenido de agua en las películas aumentó aún más (aproximadamente el 50%) y las diferencias entre las muestras

disminuyeron. Estos resultados muestran la alta higroscopicidad de las películas a altos valores de humedad relativa. En este caso también se puede observar un menor contenido de agua para la película que contiene la mayor proporción de xilano. Cuando las películas se expusieron nuevamente en las condiciones de 0% HR, se desorbió totalmente el agua incorporada en las películas 85 Xil/Q 15 (%p/p), mientras que para las demás películas se obtuvo un bajo contenido de agua residual.

Estos resultados son factores muy relevantes para determinar el almacenamiento, la estabilidad, y el alcance de estas películas de base biológica (Da Cunha Gonçalves, 2011).

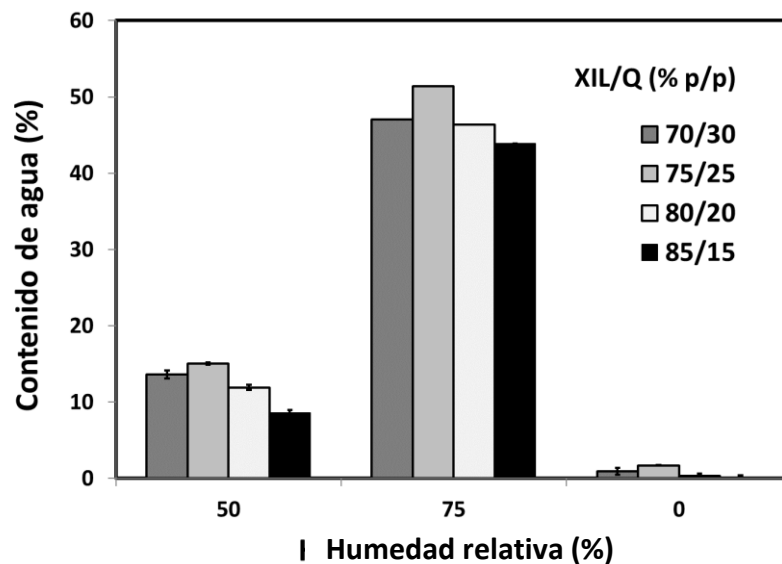


Figura 4.23. Contenido de agua en equilibrio de las películas con diferentes relaciones de masa de Xil/Q (70/30; 75/25; 80/20 y 85/15) cuando se cambió la humedad relativa en la secuencia de 0%, 50%, 75 % y 0% HR. Los contenidos de agua (%) se calcularon utilizando como valores de masa iniciales medidos a 0% de HR. Se indican las desviaciones estándar de las medias de dos réplicas del ensayo.

4.4.5.8. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Las Figuras 4.24 a) y c) muestran una fotografía y una imagen SEM de la película con una relación de masa de Xil/Q 70/30, respectivamente. Esta película en particular, además de ser la que presentó la mayor deformación y flexibilidad, es la película más transparente y uniforme de todas las evaluadas. Las Figuras 4.24 b) y d) muestra una fotografía y una imagen SEM,

respectivamente, de la película preparada con la mayor cantidad de Xil (85 Xil/15 Q (%p/p)). En esta película, se pueden observar en la fotografía la presencia de agregados.

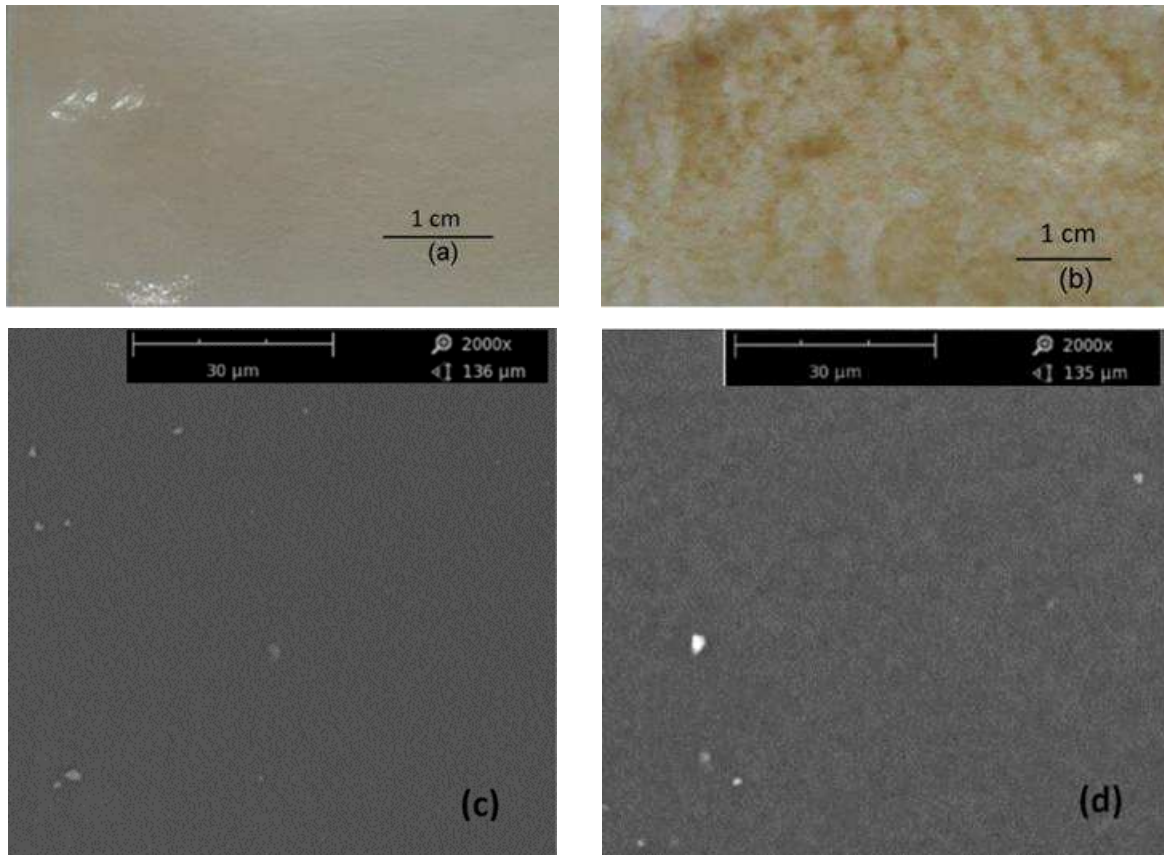


Figura 4.24. Fotografías **a)**, **b)** e imágenes SEM **c)**, **d)** de las películas de Xil/Q con diferentes proporciones de masa: Xil/Q (% p/p) 70/30 (**a y c**) y 85/15 (**b y d**). Todas las películas se formaron con glicerol al 10% p/p.

4.4.5.9. Actividad antimicrobiana

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las películas de Xil/Q (70/30 y 85/15) frente a las bacterias *Escherichia coli* (gram-negativa) y *Staphylococcus aureus* (gram-positiva).

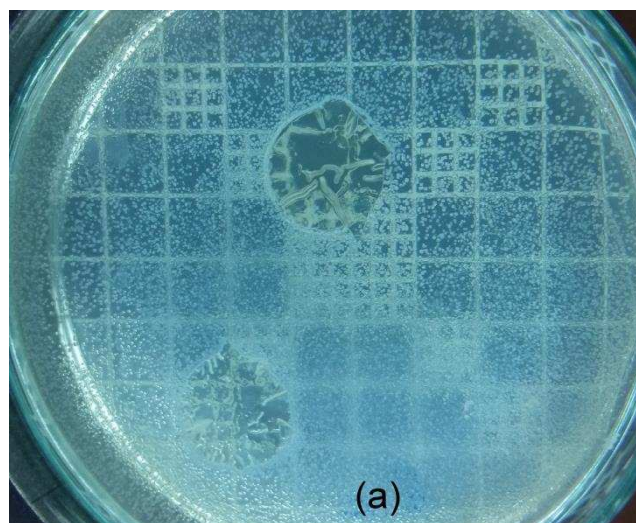
Las **Figuras 4.25 a) y b)** muestran que la película con una relación de masa de 70 Xil /30 Q (%p/p) causó favorablemente la inhibición en el área de contacto debajo de los discos de las películas contra ambos microorganismos estudiados. Favorablemente, ninguna de las películas reveló una zona inhibitoria en los alrededores, lo que sugiere que ninguno de los

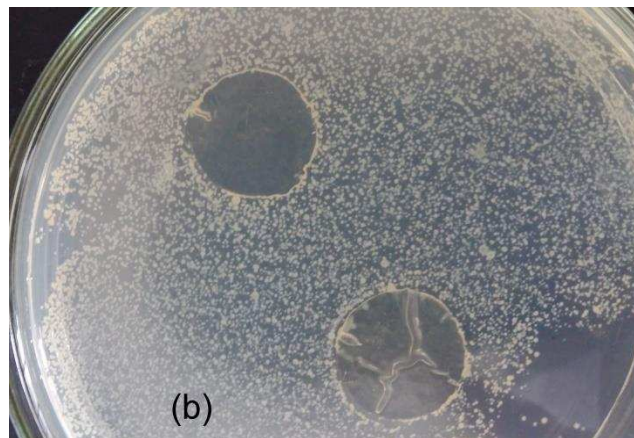
componentes del material con propiedades antimicrobianas ha migrado (difundido) al medio de agar. Dehnad y col. (2014) encontraron un comportamiento similar de inhibición utilizando el método de difusión en disco de agar para evaluar las propiedades antimicrobianas de las películas de quitosano-nanocelulosa contra *S. aureus*, *E.coli* y *S. enteritidis*.

Según Kong y col. (2010) la acción antibacteriana del Q depende principalmente del pH del medio. Cuando los valores de pH están por debajo del pKa del Q, las interacciones electrostáticas entre los grupos amina del Q y las membranas celulares microbianas con carga negativa desempeñan el papel principal en la actividad antibacteriana (Kong y col. 2010). Según Papineau y col. (1991) y Dutta y col. (2009), esta interacción resulta en la liberación de constituyentes intracelular de los microorganismos, causando la inactividad de las células.

Teniendo en cuenta que las películas preparadas en este trabajo se obtuvieron a partir de complejos de polielectrolito catiónicos a pH 5,0, el efecto inhibitorio hacia los microorganismos puede asignarse a los grupos amina libres del Q.

Por otro lado, en las **Figuras 4.26 a) y b)** se observa que las películas con una relación de masa de 85 Xil/15 Q (%p/p) no causaron la inhibición de los microorganismos, ni en el área de contacto ni en la zona que rodea los discos, probablemente debido a la falta de suficientes grupos amino libres catiónicos en la película.





Figuras 4.25. Área de inhibición de 70 Xil/30 Q (%p/p) películas frente **a)** *Escherichia coli* y **b)** *Staphylococcus aureus*

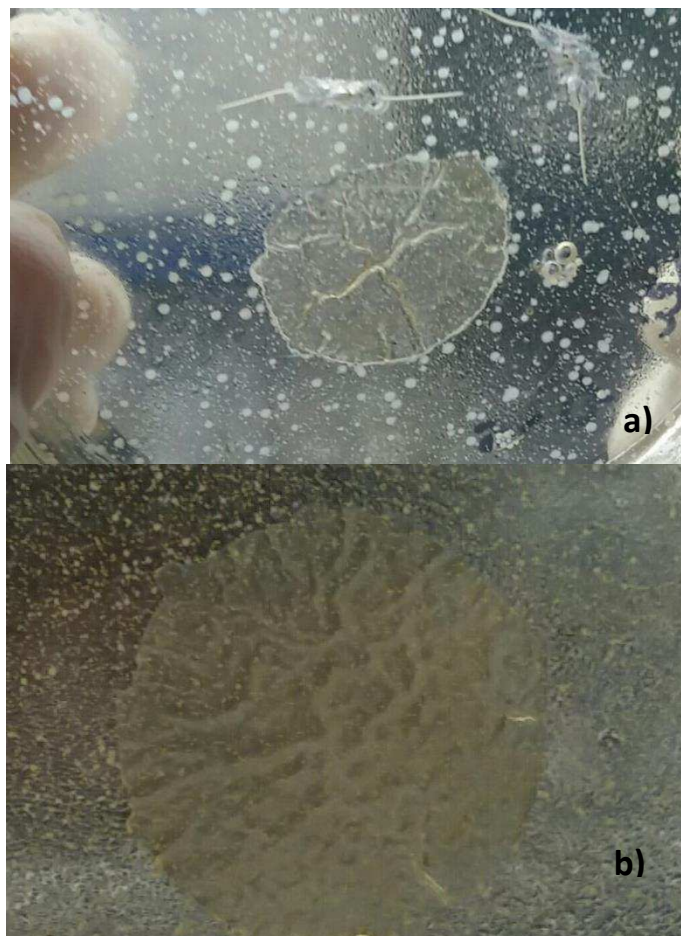


Figura 4.26. Desarrollo de microorganismo **a)** *Escherichia coli* y **b)** *Staphylococcus aureus* en los discos de películas con una relación de masa de 85 Xil/15 Q (%p/p).

4.5. CONCLUSIONES PARCIALES

En este capítulo se estudió en detalle la posibilidad de formar películas con potencial uso para embalaje conteniendo altas cantidades de xilano extraído de madera de haya.

Se demostró que, mediante un procedimiento simple, se pueden obtener películas naturales a partir de suspensiones estables de complejos de xilano y quitosano. Este procedimiento está basado en el agregado gradual del polímero de menor masa molar (Xil) sobre el polímero de mayor masa molar (Q).

El seguimiento de las cargas durante la adición de la solución de Xil sobre la solución de Q, es útil para definir una relación de masa adecuada para la formación de una película a partir de una suspensión de complejos polielectrolitos.

Respecto a los PECs obtenidos a pH 5,0 y 0,03 N NaCl, solamente los PECs homogenizados con una relación de masa de Xil/Q de 70/30 presentaron un tamaño de partícula promedio unimodal (500 nm), mientras que los PECs con una relación de masa 75/25 presentaron una distribución bimodal, el cual se puede atribuir a una incipiente agregación. Con un contenido de Xil aún mayor en la formación de los PECs (80/20 y 85/15) se observó claramente la formación de un coacervado (separación macroscópica de fases) cuando se dejaron reposar, indicando inestabilidad de los mismos.


Todas las películas formadas con las diferentes relaciones de masas mostraron excelentes propiedades de barrera al oxígeno. Esta propiedad permitirá utilizar a las películas para prolongar la vida útil de los alimentos. Sin embargo, para lograr un producto comercial, la resistencia a la humedad de estas películas debe mejorarse. De cualquier manera, su uso estaría limitado a estructuras de multicapas, combinando las películas de Xil/Q con otros materiales resistentes al vapor de agua como el LDPE.

Todas las películas mostraron propiedades mecánicas prometedoras. Particularmente, la película con una relación de masa 70 Xil/30 Q (%p/p) y en presencia de bajas cantidades de

glicerol, fue la película más transparente, uniforme, deformable y fácil de manejar. También mostró actividad antimicrobiana cuando se probó la inhibición en su superficie frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Los resultados de DMA y DVS permiten concluir que estas películas son muy hidrofílicas, ya que al aumentar la humedad relativa del medio absorben grandes cantidades de agua. Los ensayos de DMA confirmaron que en condiciones de alta humedad (80% RH), las películas absorben fácilmente grandes cantidades de agua y el módulo de almacenamiento cae a valores cercanos a cero, demostrando un comportamiento más viscoso que elástico. Sin embargo, el módulo de almacenamiento se recupera cuando se elimina la humedad (0% RH) y el compartimento del material no es afectado por los distintos ciclos de humedad.

Los resultados obtenidos en este capítulo, sugieren que las películas biodegradables con alto contenido de xilano basadas en suspensiones estables de complejos con quitosano son una alternativa prometedora para su uso en el envasado de alimentos. El potencial remplazo de los materiales convencionales no biodegradables podrá contribuir a la disminución de los residuos en el medio ambiente.



CAPÍTULO 5

HIDROGELES PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE DROGAS



5.1. INTRODUCCIÓN

Los hidrogeles son estructuras entrecruzadas compuestas de homopolímeros o copolímeros hidrofílicos. Tienen la característica de ser insolubles debido a la presencia de entrecruzamientos químicos o físicos (Peppas 1997) que le proporcionan la estructura de red y la integridad física.

Los hidrogeles se caracterizan por su capacidad de absorber agua y diferentes fluidos manteniendo su estructura (Escobar y col. 2002). Pueden mostrar cambios drásticos en su relación de hinchamiento debido a cambios en el pH, fuerza iónica del medio, temperatura, entre otros. Esta particular característica es aprovechada para distintos fines.

Particularmente, en los últimos años los hidrogeles han tenido un creciente interés en aplicaciones médicas y farmacéuticas, tales como en sistemas de liberación controlada de fármacos oral (Shu y col. 2001; Sun y col. 2013; Karaaslan y col. 2010) y por medio de parches dérmicos (Don y col. 2008), dispositivos subcutáneos, encapsulación de células (Tan y Takeuchi 2007) e ingeniería tisular (Bush y col. 2016).

Con los métodos tradicionales de liberación de medicamentos, principalmente por vía oral o intravenosa, se obtienen controles muy pobres sobre los niveles de fármaco adecuados para alcanzar la acción terapéutica demandada por el tratamiento. Esta falta de control provoca que el medicamento, que en principio puede ser efectivo para tratar la enfermedad, no se administre ni en cantidad, ni en tiempo, ni en el lugar esperado para que el tratamiento sea eficaz. Por lo tanto, contar con hidrogeles que, según las condiciones del medio líquido, sean capaces de modificar su comportamiento y por lo tanto su interacción con el fármaco en estudio, es de gran interés.

En la **Figura 5.1**, se muestran varios de los estímulos externos que han sido estudiados por diferentes autores para modular la administración de fármacos, como la radiación de luz, la fuerza iónica, la temperatura, el pH, etc.

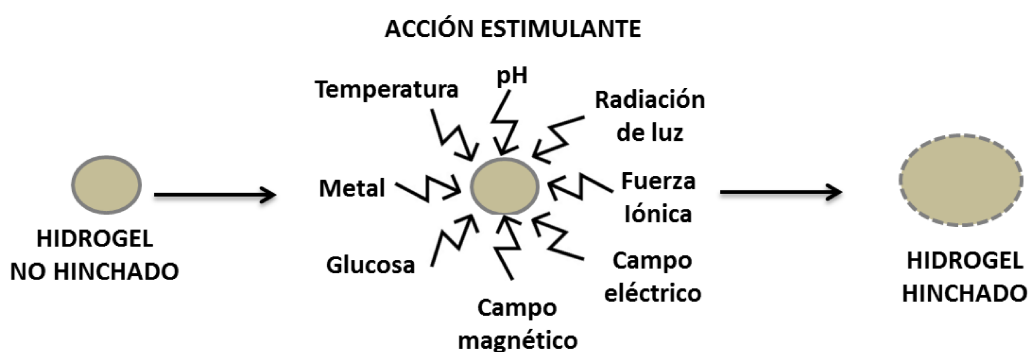


Figura 5.1. Estimulaciones externas que se le aplican al hidrogel (Gupta y col. 2002).

Particularmente, los “hidrogeles sensibles al cambio de pH” son todos aquellos formados por cadenas poliméricas con grupos iónicos cuyo grado de ionización se ve afectado por la fuerza iónica y pH del medio.

Los hidrogeles que contienen grupos aniónicos se encuentran ionizados a un pH del medio mayor que el pK_a de la red polimérica. Bajo estas condiciones ocurre un hinchamiento del hidrogel debido a la diferencia de presión osmótica generada por la presencia de iones. Lo contrario ocurre cuando los hidrogeles contienen grupos catiónicos, su capacidad de hinchamiento es mayor a pH menores que el de su pK_a (Gupta y col. 2002).

Teniendo en cuenta las variaciones del pH que se producen en distintos sitios corporales, tales como en el tracto gastrointestinal, los vasos sanguíneos, etc., se pueden utilizar hidrogeles sensibles al pH, para la liberación del fármaco en estudio en el sitio de interés.

El concepto de formación de complejos de polielectrolitos (PECs) en el diseño de sistema de liberación de droga ha sido muy utilizado durante las últimas dos décadas (Lankalapalli y Kolapalli 2009). En general, los PEC son bien tolerados, son biocompatibles y sensibles a cambios en las condiciones ambientales y, por lo tanto, presentan ventajas claras para el control de liberación de fármacos (Meka y col. 2017). La sustancia activa puede incorporarse a los PECs de cuatro maneras diferentes (Krone y col. 1997): puede ser atrapada en la solución durante la formación del complejo, incorporada al complejo ya formado, unirse

químicamente a al menos un polímero del complejo, y precipitarse durante la formación del complejo.

La interacción iónica entre los polímeros que forman el PEC, puede ser reforzada por la adición de agentes de entrecruzamiento. Estos últimos se definen como moléculas que contienen al menos dos grupos funcionales reactivos que permiten las formaciones de uniones entre las cadenas de los polímeros (Berger y col. 2004). Dependiendo del tipo de agente entrecruzante utilizado, los hidrogeles se pueden clasificar como hidrogeles iónicamente o covalentemente entrecruzados.

Karaaslan y col. (2010) obtuvieron hidrogeles mezclando xilano y quitosano entrecruzado de manera covalente con el glutaraldehído. Específicamente estudiaron la liberación *in vitro* de riboflavina (vitamina B2), y encontraron que sólo puede tener aplicación como sistema de liberación controlada a pH 7,4. A pH ácido se libera en forma “explosiva”.

Una desventaja que presentan los agentes de entrecruzamiento covalentes es que pueden inducir toxicidad (Shu y col. 2001, Berger y col. 2004). En cambio, los agentes de entrecruzamiento iónico pueden considerarse como biocompatibles (Berger y col. 2004). Si bien los enlaces iónicos producen hidrogeles menos estables cuando se sumergen en agua, éstos ofrecen más posibilidades como sistema de liberación controlada de drogas que los covalentemente enlazados (Berger y col. 2004).

Por lo tanto, en este trabajo de Tesis se planteó utilizar el ácido cítrico/citrato de sodio que actúa como agente de entrecruzamiento del tipo iónico. La FDA (food and drug administration, USA) reconoce al ácido cítrico como seguro y lo autoriza como aditivo alimentario y tiene función emulsionante, estabilizadora, reguladora de la acidez y secuestrante.

Como se muestra en la **Figura 5.2** este agente de entrecruzamiento iónico presenta tres grupos carboxílicos que se pueden encontrar en su forma ionizada dependiendo de las condiciones del medio líquido.

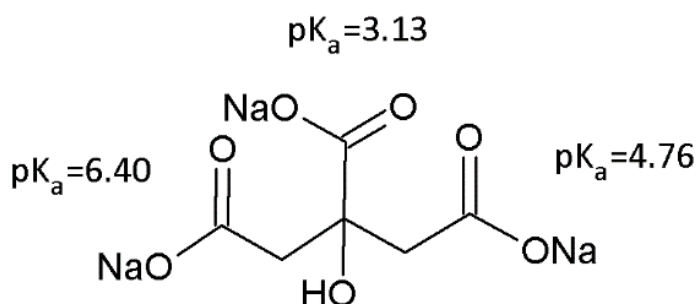


Figura 5.2. Estructura de la molécula de citrato de sodio, con sus correspondientes valores de los pK_a de los grupos carboxilos.

Las condiciones ambientales (concentración de sal, pH y presencia de moléculas que contienen grupos iónicos débiles) pueden además inducir la liberación del agente de entrecruzamiento iónico desde el hidrogel al medio líquido (Berger y col. 2004). Sin embargo, entendemos que ese comportamiento puede ser aprovechado para permitir la incorporación de fármacos iónicos débiles a través de un fenómeno de intercambio iónico. Según nuestro conocimiento, el intercambio iónico aún no ha sido muy considerado en la bibliografía relativa a la liberación controlada de droga.

El xilano ha sido considerado como una materia prima adecuada para producir sistemas de administración de fármacos colónicos, ya que es resistente a la digestión en el estómago humano y en su paso por el intestino delgado y finalmente es biodegradado por las enzimas producidas por la microflora colónica como la *Bifidobacterium* (Kumar y Negi 2014). Además, se ha mostrado que pueden inhibir la tasa de crecimiento de algunos tumores (Kong y col. 2014).

Sun y col. (2013) prepararon hidrogeles de xilano extraído de paja de trigo (11% p/p) entrecruzado de forma covalente con poli (ácido acrílico) (79% p/p) y evaluaron la liberación *in vitro* del ácido acetilsalisílico y de la teofilina. Los estudios revelaron que los hidrogeles son adecuados como sistemas para la liberación oral de medicamentos, dada la sensibilidad al pH y la biodegradabilidad de los mismos.

Por otro lado, el quitosano es biocompatible y biodegradable a través de enzimas humanas y, por lo tanto, es adecuado para aplicaciones biológicas y biomédicas. Este material fue aprobado por la FDA para su aplicación en ingeniería de tejidos y en la administración de

fármacos (Mohammed y col. 2017). Además, presenta permeabilidad selectiva, actividad antimicrobiana, capacidad de quelación y capacidad de absorción (Yadav y col. 2015). Todas estas propiedades le proporcionan una variedad de aplicaciones al quitosano además de su uso como sistema para la liberación de drogas: como antibacteriano (Kong y col. 2010), antiácido (Sano y col. 2003), promueve la osteogénesis (Tanodekaew y col. 2004), y promueve la curación de úlceras y lesiones (Mori y col. 2005). Sin embargo, el quitosano solo tiene una capacidad limitada para la liberación oral de fármacos debido a su rápida disolución en un medio ácido, como el del estómago (Hamman 2010).

La cinética de liberación de un fármaco desde los hidrogeles depende de algunas condiciones particulares, como la cantidad de fármaco incorporado, la solubilidad del fármaco, las interacciones fármaco-polímero y las características del hidrogel (Kim y col. 1992). Además, otros factores, como el tamaño del fármaco y el tamaño de los poros de la matriz polimérica, también pueden afectar el comportamiento de liberación (Huang y col. 2001). Según Caló y Khutoryanskiy (2015), el proceso de liberación del fármaco puede ocurrir a través de diferentes mecanismos, puede ser controlada por difusión, por hinchamiento, controlada químicamente o por un estímulo externo.

En esta Tesis, se propuso utilizar como droga de estudio el diclofenaco sódico (ácido 2-{2-[(2,6-diclorofenil) amino] fenil acético) (**Figura 5.3**), el cual es un medicamento antiinflamatorio no esteroideo (AINE). El diclofenaco es un derivado fenilacético, es un ácido débil y una droga hidrofílica. Presenta una solubilidad de 20 mg/mL en agua (Žilnik y col. 2007) pero a $\text{pH} < 7,0$ es muy poco soluble. Se puede administrar mediante vía oral, absorbiéndose principalmente en el intestino.

Otras formas de administración son vía intramuscular y mediante aplicación transdérmica. El diclofenaco sódico no puede penetrar efectivamente a través de la piel y por lo tanto no puede alcanzar la concentración efectiva en el sitio de acción luego de la aplicación transdermal. Para lograrlo otros autores han propuesto el uso de mejoradores de la penetración como el dimetil sulfóxido (DMSO) (Özgüney y col. 2006).

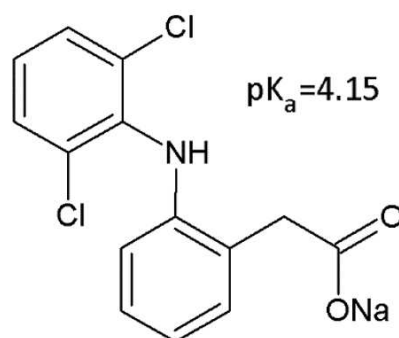


Figura 5.3. Estructura de la molécula de sal de diclofenaco de sodio, con su correspondiente valor del pK_a del grupo carboxílico.

Cuando se administra por vía oral el diclofenaco sódico, se absorbe casi completamente en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, debido al efecto de primer paso hepático, sólo un 50% a 60% de la dosis alcanza la circulación sistémica al cabo de 1,5 a 2,5 horas (Feria 1997).

Un efecto indirecto que tiene el diclofenaco sódico, como todas las drogas no esteroides, una vez que se absorbe y alcanza la circulación sistémica, es que inhibe la enzima ciclooxigenasa (COX) necesaria para la síntesis de prostaglandinas en el epitelio del estómago, haciéndolo mucho más vulnerable a la corrosión por los ácidos gástricos.

Los efectos secundarios más comunes de este medicamento son: irritación gástrica, gastritis, úlcera péptica y sangrado (Khazaeinia y Jamali 2003, Gilman y col. 1991). Por lo tanto, en vista de su corta vida media en el plasma (2 h) y a los efectos secundarios asociados, la liberación controlada es una buena alternativa para mejorar su efectividad.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de las películas de Xil/Q para actuar como hidrogeles sensibles al pH y a la fuerza iónica para su uso en la liberación controlada de drogas. Se evalúa el tratamiento de las películas tratadas con un ácido policarboxílico, el citrato de sodio, para que actúe como agente de entrecruzamiento iónico y como agente intermediario para promover el intercambio iónico con la droga en el hidrogel. Los hidrogeles son caracterizados en detalle.

Para los estudios de liberación controlada de drogas (in vitro), el principio activo considerado es el diclofenaco sódico (DS). Se estudian los efectos de la fuerza iónica y del pH durante estos procedimientos de carga y liberación.

5.2. MATERIALES

- Se utilizó el mismo xilano y quitosano, descritos previamente en el capítulo 4.
- Citrato de sodio grado pro- análisis (Cicarelli).
- Diclofenaco sódico, provisto por Sigma Aldrich > 99% de pureza.
- El resto de los reactivos utilizados fueron grado pro-análisis.

5.3. MÉTODOS

5.3.1. Preparación de películas para su uso como hidrogeles

Las películas fueron obtenidas siguiendo el mismo procedimiento que el utilizado para la obtención de películas de Xil/Q para embalaje (**capítulo 4, sección 4.3.4.4**). La única diferencia es que en este caso no se adicionó plastificante a la solución de Q cuando se formaron las suspensiones de PECs catiónicos, ya que el mismo se solubilizaría en medio líquido.

Los hidrogeles se obtuvieron a partir de películas preparadas con una relación de masas 70 Xil / 30 Q (%p/p). La selección de esta relación de masas se realizó teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el **capítulo 4**. Particularmente estas películas mostraron tener buenas propiedades mecánicas y ser homogéneas. Utilizando esta relación de masa,

se obtienen CatPECs catiónicos que permiten obtener hidrogeles conteniendo grupos aminas libres, por lo tanto, el hidrogel será catiónico en pH ácido.

Una vez formadas las películas y secadas, se lavaron durante 24 h en agua destilada para eliminar las sales presentes, así como también el ácido acético presente proveniente de la solución de quitosano utilizada para formar el hidrogel. Luego, las películas fueron secadas nuevamente bajo tensión sobre papeles secantes y se guardaron en condiciones de 50% HR y a 23°C para sus posteriores estudios. (**Esquema 5.1**).



Esquema 5.1. Secuencia para la obtención los hidrogeles de Xil/Q.

5.3.2. Tratamiento de las películas con agente de entrecruzamiento iónico

Para llevar a cabo los tratamientos con el agente de entrecruzamiento, se siguió la metodología propuesta por Shu y col. (2001) utilizando películas de quitosano. Las películas lavadas y acondicionadas al 50% RH y a 23 °C, se sumergieron en soluciones de diferentes concentraciones de citrato de sodio a pH 5,0 (0%, 3% y 7% p/v) por una hora y a 4°C con el fin de lograr un entrecruzamiento iónico en la estructura de las películas. Luego, para eliminar el exceso del agente de entrecruzamiento se sumergieron en agua durante 30 min y se secaron bajo tensión.



Figura 5.4. Hidrogeles luego del tratamiento con agente de entrecruzamiento iónico.

5.3.3. Caracterización de los hidrogeles

5.3.3.1. Análisis mediante FTIR

Los hidrogeles con y sin agente de entrecruzamiento fueron caracterizados por Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), utilizando un Espectrómetro Shimadzu FTIR - 8000, en modo absorbancia en el rango de 400-4000 cm^{-1} .

Para las mediciones, las películas fueron previamente secadas en estufa con vacío a 60°C y 60 mmHg.

5.3.3.2. Morfología por microscopía SEM

Las morfologías superficiales y transversales de las películas tratadas y no tratadas con citrato de sodio se examinaron utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM, Phenom ProX, Phenom-World, Países Bajos). Las muestras fueron previamente liofilizadas durante 24 h y luego se colocaron en rejillas metálicas utilizando cinta adhesiva de doble cara y se recubrieron con oro antes de la observación.

5.3.3.3. Propiedades mecánicas en húmedo

Se evaluaron las propiedades mecánicas de los hidrogeles con y sin agente de entrecruzamiento mediante el ensayo de resistencia a la tracción y estiramiento hasta la rotura en húmedo. Los ensayos se realizaron siguiendo la norma ASTM D882. Las

muestras se colocaron en agua durante 1 h a 23 °C y luego, se retiraron de la solución. Se eliminó el exceso de solución presionándolos ligeramente entre dos papeles secantes, de acuerdo a lo propuesto por Karaaslan y col. (2010). Se utilizó una máquina de ensayo Universal Instron (modelo 3344), con una celda de carga de 1000 N, a una velocidad de extensión de 4 mm/min y con una distancia inicial entre las mordazas de 22 mm. Para cada hidrogel se cortaron 5 muestras en forma de hueso de acuerdo con la norma ASTM D1708-96s, como fue previamente mencionado en el **capítulo 4 (sección 4.3.4.4)**.

5.3.3.4. Solubilidad y capacidad de hinchamiento

Se determinó la capacidad de hinchamiento y solubilidad de las películas con y sin agente de entrecruzamiento, sumergiendo las películas en solución *buffer* fosfato salino (PBS) a pH 7,4 y a dos fuerzas iónicas distintas (9 mM, 160 mM), a 37°C durante 24 h. Los ensayos también fueron evaluados por inmersión de las películas en solución de HCl 0,01N (pH 2,0) y a una fuerza iónica de 160 mM.

Los hidrogeles acondicionados (50% ± 2% HR y 23 °C ± 1 °C) se cortaron en muestras de 1,2 cm² de tamaño y se pesaron con una precisión de ± 0,1 mg. Al mismo tiempo, se determinó el contenido de humedad secando la película en una estufa con vacío a 60 ° C durante 24 h (Peso_{inicial seco}). Se sumergieron cuatro muestras de hidrogeles en un vaso de precipitado con 40 mL de solución de PBS a pH 7,4 (fuerza iónica: 160 mM) o una solución de PBS diluida en agua (fuerza iónica: 9 mM). A diferentes intervalos de tiempo (1, 2, 3, 8, 12 y 24 h), se retiraron las muestras y se eliminó el exceso de agua, presionándolas ligeramente entre dos papeles secantes. Luego, las muestras se pesaron inmediatamente (Peso_{húmedo final}). La capacidad de hinchamiento se calculó de acuerdo con la **ecuación 5.1** (Karaaslan y col. 2010):

$$\text{Capacidad de Hinchamiento} = \frac{\text{Peso}_{\text{húmedo final}} - \text{Peso}_{\text{inicial seco}}}{\text{Peso}_{\text{inicial seco}}} * 100 \quad (\text{Ec. 5.1})$$

Los ensayos en solución de HCl 0,01 N (pH 2,0) y a una fuerza iónica de 160 mM, se realizaron utilizando el mismo procedimiento.

Para los ensayos de solubilidad, las muestras utilizadas para la determinación de la capacidad de hinchamiento, fueron lavadas con agua destilada durante 5 minutos y secadas en estufa de vacío a 60 °C durante 48 h. La solubilidad se determinó utilizando la **ecuación 4.3** mencionada en el capítulo 4 para determinar la solubilidad de las películas.

5.3.3.5. Determinación de ácido cítrico por cromatografía líquida

Se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para determinar la cantidad de citrato de sodio liberado a partir del hidrogel reticulado (7% p/v de citrato de sodio), cuando se evaluó su capacidad de hinchamiento y cuando se realizó la incorporación del principio activo.

El equipo utilizado fue un Perkin Elmer 200 FLEXAR, (Norwalk, EEUU) que se encuentra en el ITA- FIQ (Instituto Tecnológico de Alimentos), utilizando una columna Aminex HPX 87H y fase móvil H₂SO₄ 0,01M en forma isocrática a 65 °C. Se utilizó un detector de UV-visible a 210 nm (Krukowski y col. 2017).

El hidrogel entrecruzado se dividió en dos partes: una parte fue utilizada para determinar la cantidad inicial de citrato de sodio presente en el hidrogel sumergiéndolo en una solución de alta fuerza iónica (NaCl 115 mM y NaOH) y alto valor de pH (pH 12) durante 24 h, la liberación del agente de entrecruzamiento es total. La otra parte se usó para determinar la cantidad de citrato de sodio liberado al medio líquido cuando se determinó la capacidad de hinchamiento del hidrogel entrecruzado (7% p/v) en solución de PBS a dos concentraciones iónicas (9 mM y 160 mM) a pH 7,4 luego de 24 h.

Además, se usó otro hidrogel entrecruzado para determinar la concentración de liberación de citrato de sodio después de sumergirlo en una solución de sal sódica de diclofenaco (concentración de fármaco 9 mM) durante 20 horas a 23 °C.

Todas las películas se retiraron del medio líquido y, a continuación, las soluciones se ajustaron a pH 2,0 con H₂SO₄ y se filtraron (0,22 µm) antes de inyectar en la columna. A pH 2,0, el diclofenaco sódico precipita, por lo que la muestra se centrifugó primero a 3500rpm durante 30 minutos y luego se inyectó el sobrenadante.

5.3.4. Evaluación de los hidrogeles en la liberación controlada de droga

Para evaluar el potencial de los hidrogeles de Xil/Q como sistema para la liberación controlada de drogas, se realizaron ensayos de incorporación y liberación *in vitro* del diclofenaco sódico. Los ensayos se realizaron a los hidrogeles tratados y no tratados con el agente de entrecruzamiento.

5.3.4.1. Incorporación del principio activo

La cantidad de principio activo incorporado en los hidrogeles no entrecruzados y entrecruzados se determinó de manera similar a la metodología propuesta por Tarvainen y col. (1999). La determinación se realizó sumergiendo paralelamente 2 hidrogeles (9 cm²) en dos recipientes distintos conteniendo 25 mL de solución del fármaco a concentración, fuerza iónica y pH previamente acondicionados. Como la cantidad de fármaco incorporado depende de la concentración de la solución de fármaco empleada (Andrade-Vivero y col. 2007), se utilizaron dos concentraciones iniciales del fármaco: 9 y 24 mM de diclofenaco sódico. La incorporación se realizó utilizando un agitador orbital (PSU-10 i Boeco) a una velocidad de 100 rpm durante 20 h a 23 °C.

Luego de las 20 h de inmersión uno de los hidrogeles se utilizó para los ensayos de liberación y el otro para determinar la cantidad total absorbida.



Figura 5.5. Agitador orbital utilizado para la incorporación y liberación del diclofenaco sódico desde los hidrogeles.

5.3.4.2. Liberación del principio activo

Los ensayos de liberación *in vitro* se realizaron por inmersión del hidrogel conteniendo el fármaco en 25 mL de solución de PBS (fuerza iónica: 160 mM) a pH 7,4,

37°C y con agitación orbital a 100 rpm. Se seleccionó el PBS debido a que la osmolaridad y la concentración iónica de la solución coinciden con las de los fluidos del cuerpo humano (solución isotónica).

Las curvas de liberación fueron obtenidas tomando a diferentes intervalos de tiempo alícuotas de 3 mL de la solución y determinando la cantidad de fármaco liberado midiendo en un espectrofotómetro UV-vis (CECIL 3055) a 275 nm. Se trabajó en forma similar a lo realizado por Shu y col. (2001), a volumen constante reponiendo el mismo volumen de solución del medio de liberación y considerando esta dilución en los cálculos de liberación.

5.3.4.3. Efecto del secado y del tamaño del hidrogel

Se realizaron experimentos de secado a los hidrogeles tratados con solución de citrato de sodio 7% (p/v) luego realizar la incorporación del principio activo. El hidrogel se secó en una estufa de vacío (60 °C, 60 mmHg) durante 24 h. Luego, sobre el hidrogel seco se evaluó la liberación en HCl (pH 2,0; 3 h) y luego en solución de PBS (pH 7,4; fuerza iónica: 160 mM). Además, se realizaron experimentos adicionales en los cuales se redujo el tamaño de los hidrogeles cargados con el principio activo para evaluar el efecto en la liberación. Los hidrogeles secos fueron cortados a mano con tijeras para obtener piezas de 0,25 cm².

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Caracterización de los hidrogeles

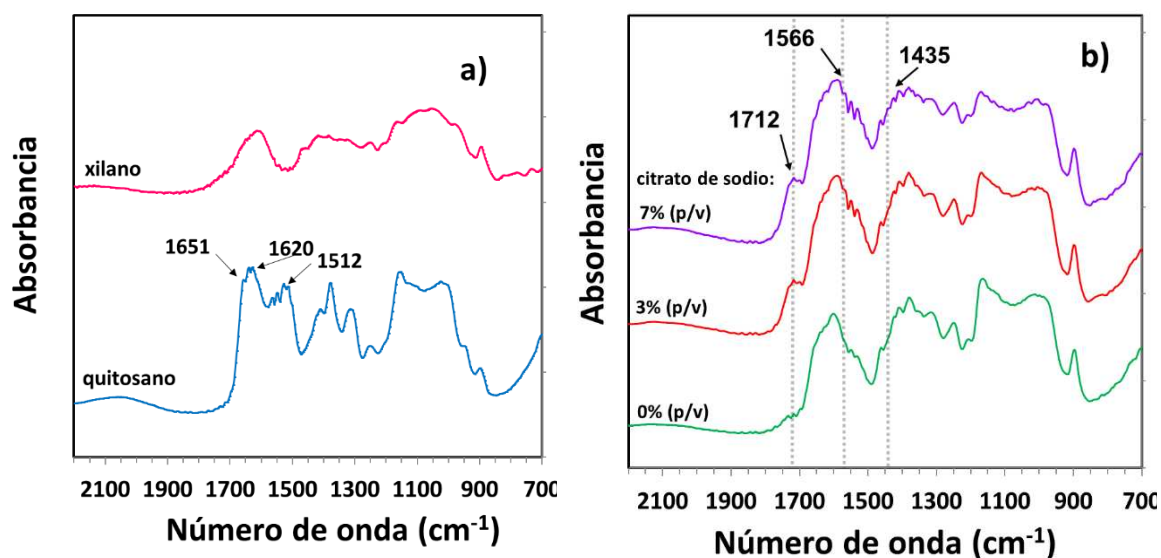
5.4.1.1. Análisis por FTIR

La **Figura 5.6 a)** muestra los espectros de FTIR del Q y del Xil en el rango de 2100-700 cm⁻¹ obtenidos a partir de las películas de Xil, Q, y de Xil/Q no tratadas y tratadas con ácido cítrico. En esta región, se pueden observar las bandas características del Q en

1651 cm^{-1} , 1620 cm^{-1} y 1512 cm^{-1} debido a la vibración de tensión -C=O (amida I), a la vibración de flexión (NH) de la amina primaria no acetilada y debido a la vibración de flexión NH (amida II), respectivamente (Li y col. 2011, Chen y col. 2016). Estos picos se encuentran en la misma región que la vibración correspondiente a la vibración de tensión del ácido glucurónico (COO^-) en su forma ionizada del xilano (desde 1625-1550 cm^{-1}). En ninguno de los dos espectros se observa vibración en la región de 1715 cm^{-1} .

La **Figura 5.6 b)** muestra los espectros de FTIR de los hidrogeles de Xil/Q no tratados (0% p/v) y de los hidrogeles tratados con un 3% y 7% (p/v) de solución de citrato de sodio. Comparando el espectro de los hidrogeles no tratados de Xil/Q, los hidrogeles tratados muestran una banda evidente en 1712 cm^{-1} , la cual es asignada a las vibraciones de tensión (C = O) de los grupos carboxílicos no ionizados del agente de entrecruzamiento (Skoog 2001).

De acuerdo con Shu y col. (2001), el grado de ionización del citrato de sodio a pH 5,0 es de aproximadamente 0,6, indicando que al menos un grupo carboxilo del citrato de sodio se encuentra en su forma no ionizada al pH de trabajo. Además, dos nuevos picos se observan a 1566 cm^{-1} y a 1435 cm^{-1} debido a la presencia de grupos carboxilos ionizados (Skoog 2001) del citrato de sodio. Por lo tanto, estos resultados indican la presencia del citrato de sodio en el hidrogel.



Figuras 5.6. a) Espectros FTIR de xilano y quitosano solos; **b)** hidrogeles tratados con diferentes concentraciones de agente de entrecruzamiento (0%; 3%; 7% p/v de citrato de sodio).

5.4.1.2. Morfología por microscopía SEM

La **Figura 5.7** muestra las morfologías de las secciones transversales y superficiales de los hidrogeles entrecruzados y no entrecruzados de Xil/Q previamente liofilizados durante 24 h. Las imágenes correspondientes a la sección transversal (**Figura 5.7 a y c**) muestran que las películas presentan una estructura homogénea. Particularmente, en la superficie de las películas existe una mayor diferencia. Se pueden observar algunos poros a lo largo de la película no tratada (**Figura 5.7 b**), mientras que en el material tratado con citrato de sodio se observa una superficie más continua (**Figura 5.7 d**). Esto puede asignarse a una restructuración del hidrogel durante el entrecruzamiento iónico, en el cual se hincha y posteriormente es secado. Podría esperarse que la ausencia de poros en el interior y en superficie de la película reticulada conduzca a una liberación más controlada del fármaco, como fue sugerido por Cursaru y col. (2013).

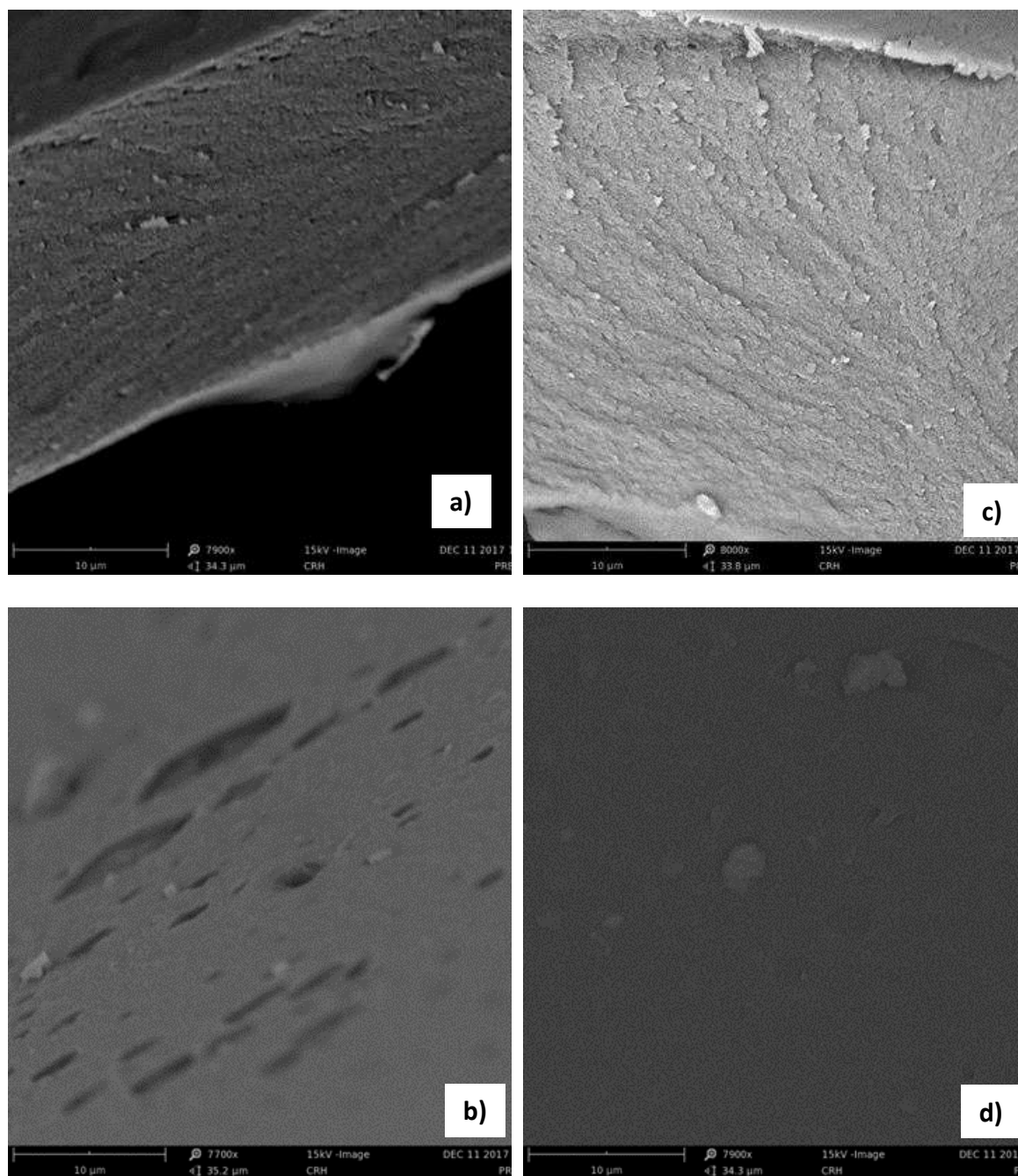


Figura 5.7. Microscopías electrónicas de barrido (SEM) de las películas sin tratamiento: **a)** sección transversal y **b)** superficial; y de las películas tratadas con 7% p/v de citrato de sodio: **c)** sección transversal y **d)** superficial. Las películas fueron previamente liofilizadas durante 24 h y recubiertas con oro antes de su observación.

5.4.1.3. Propiedades mecánicas en húmedo

Los ensayos de resistencia a la tracción y a la deformación hasta la rotura en húmedo de los hidrogeles entrecruzados y no entrecruzados fueron realizados luego de la inmersión de las películas en agua por 1 h a 23 °C. La **Tabla 5.1** muestra que ambas propiedades aumentaron cuando las películas fueron tratadas con el agente de

entrecruzamiento iónico (0%; 3%; 7% (p/v) citrato de sodio). Particularmente, el entrecruzamiento con citrato de sodio al 7% (p/v) mostró un incremento del 150% en la resistencia a la tracción (3,0 MPa) y un incremento del 57% en la deformación hasta la rotura en húmedo (14,8%), siendo los valores del hidrogel no entrecruzado de 1,2 MPa y 9,4% respectivamente. Al aumentar la concentración de citrato de sodio del 3% al 7% (p/v), solo la resistencia a la tracción aumentó significativamente (Test de Anova de una vía $p < 0,05$).

El aumento en la resistencia a la tracción indica que las interacciones iónicas producidas entre los grupos ácidos carboxílicos del citrato de sodio y entre los grupos amina de las cadenas de quitosano, conducen a una estructura de red con mayor entrecruzamiento, permitiendo de esta manera una mejora en la resistencia del hidrogel. El aumento de la deformación se puede atribuir al citrato de sodio que interacciona con una sola carga a las cadenas de Q y que actúa como plastificante. Shi y col. (2008) encontraron un comportamiento en la deformación similar para películas de almidón / poli (vinil alcohol) con diferentes concentraciones de ácido cítrico.

Karaaslan y col. (2010) informaron menores valores de la resistencia a la tracción en húmedo de los hidrogeles obtenidos a partir de hemicelulosas de álamo y quitosano (relación de masa: 70:30). Informaron valores de resistencia a la tracción en húmedo de 0,46 MPa y valores de deformación a la rotura del 12,7%. Según estos autores, incluso después del entrecruzamiento químico con glutaraldehído, las probetas fueron difíciles de manipular. La diferencia puede deberse a que el pH final que obtuvieron luego de mezclar ambos polímeros fue menor a pH 5,0 y por lo tanto muy pocos grupos carboxílicos del xilano se encuentran ionizados para interactuar con los grupos amina del quitosano.

Tabla 5.1. Propiedades mecánicas en húmedo de los hidrogeles no tratados y tratados con diferentes concentraciones de agente de entrecruzamiento (citrato de sodio 3,0 y 7,0 %p/v). Las películas fueron inmersas en agua destilada a 23°C durante una hora antes del ensayo.

Concentración de citrato de sodio (% p/v)	Resistencia a la tracción (MPa)*	Deformación a la rotura (%)*
0	1,23 ± 0,23	9,4 ± 1,0

3	2,21 ± 0,21	13,8 ± 1,5
7	3,01 ± 0,26	14,8 ± 2,4

(*) Las desviaciones estándar del promedio de cinco réplicas del ensayo.

La **Figura 5.8** muestra una fotografía del hidrogel tratado con solución de citrato de sodio 7 % p/v luego de una inmersión en agua destilada durante 24 h a 23°C. Se puede observar que el hidrogel mantiene su integridad después de la inmersión.



Figura 5.8. Hidrogel entrecruzado con solución de citrato al 7% (p/v), luego de sumergirlo en agua destilada durante 24 h a 23° C.

5.4.1.4. Capacidad de hinchamiento y solubilidad

Los ensayos de capacidad de hinchamiento y de solubilidad de los hidrogeles no entrecruzados y entrecruzados se realizaron en *buffer* fosfato salino (PBS) a dos fuerzas iónicas (9 mM y 160 mM) y a dos valores de pH (7,4 y 2,0). Se espera que los cambios en las condiciones del medio líquido modifiquen las densidades de cargas globales de los polímeros y del agente de entrecruzamiento, lo que determina directamente la densidad de entrecruzamiento, la interacción y el hinchamiento del hidrogel.

a) Efecto de la fuerza iónica

La **Figura 5.9 a)** muestra la capacidad de hinchamiento en función del tiempo de los hidrogeles no entrecruzados y entrecruzados luego de sumergirlos en solución de PBS a baja fuerza iónica (9 mM) y a pH 7,4. Se puede observar que la capacidad de hinchamiento de todos los hidrogeles aumentó con el tiempo. Los hidrogeles no tratados mostraron una capacidad de hinchamiento del 170% luego de las 24 h y mantuvieron su

integridad. La figura también muestra que al aumentar la concentración de la solución del agente de entrecruzamiento (del 3% p/v al 7% p/v de citrato de sodio), la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles disminuyó, lo que indica la presencia de nuevos entrecruzamientos en la matriz polimérica. Particularmente, el hidrogel tratado con 7% p/v de citrato de sodio mostró un valor en la capacidad de hinchamiento de 106% luego de las 24 h. El efecto de este agente de entrecruzamiento sobre la capacidad de hinchamiento de hidrogeles de quitosano solo fue también observado por Shu y col. (2001).

Como el citrato de sodio es una molécula de bajo peso molecular se espera que pueda intercambiarse con los contraiones presentes en el medio líquido (Tarvainen y col. 1999), como el fosfato y el cloruro de la solución del PBS. Por este motivo, luego de evaluar la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles tratados con citrato de sodio (7 %p/p), se realizaron análisis de HPLC en las soluciones de PBS finales para determinar la cantidad de agente de entrecruzamiento liberado al medio líquido durante este ensayo.

Los resultados de HPLC (**Tabla 5.2**) muestran que la cantidad de citrato de sodio liberado luego de las 24 h de inmersión en PBS a baja fuerza iónica fue de 26,9 mg de citrato / g de hidrogel, el cual corresponde al 46% de la cantidad total de citrato de sodio presente en el hidrogel tratado con solución de agente de entrecruzamiento al 7% p/v (58,2 mg de citrato/g de hidrogel). La cantidad inicial de citrato de sodio presente en el hidrogel se determinó como fue descrito en la **sección 5.3.3.5**. Es de esperar que el citrato que no fue liberado actúe como agente entrecruzante en el hidrogel, generando una disminución en la capacidad de hinchamiento.

La **Figura 5.9 b**) muestra la capacidad de hinchamiento en función del tiempo de los hidrogeles no tratados y tratados, cuando se sumergieron en soluciones de PBS a alta fuerza iónica (160 mM) y a pH 7,4. La figura muestra que el hinchamiento de todos los hidrogeles aumentó hasta alcanzar un equilibrio a las 8 h aproximadamente. Particularmente, cuando se evaluaron los hidrogeles no tratados, la capacidad de hinchamiento alcanzó valores del 220%. Algunos autores (Berger y col. 2004; Shu y col. 2001) informaron que una alta concentración de iones presentes en la solución puede

debilitar las interacciones iónicas a través de un efecto de apantallamiento, lo que puede generar un aumento en la capacidad de hinchamiento. En este caso se puede observar que cuando se aumentó la concentración de iones presentes en el medio líquido, la capacidad de hinchamiento del hidrogel no tratado aumentó del 170% al 220%.

Particularmente, cuando se evaluaron los hidrogeles entrecruzados (3% p / v de citrato de sodio), los porcentajes de hinchamiento fueron cercanos al 300% (**Figura 5.9 b**). Para este caso, los resultados de HPLC muestran que la cantidad de citrato de sodio liberada al medio líquido (PBS 160 mM) fue de 56,2mg de citrato/g de hidrogel, indicando que casi todo el citrato de sodio presente en el hidrogel fue liberado con el aumento de la fuerza iónica.

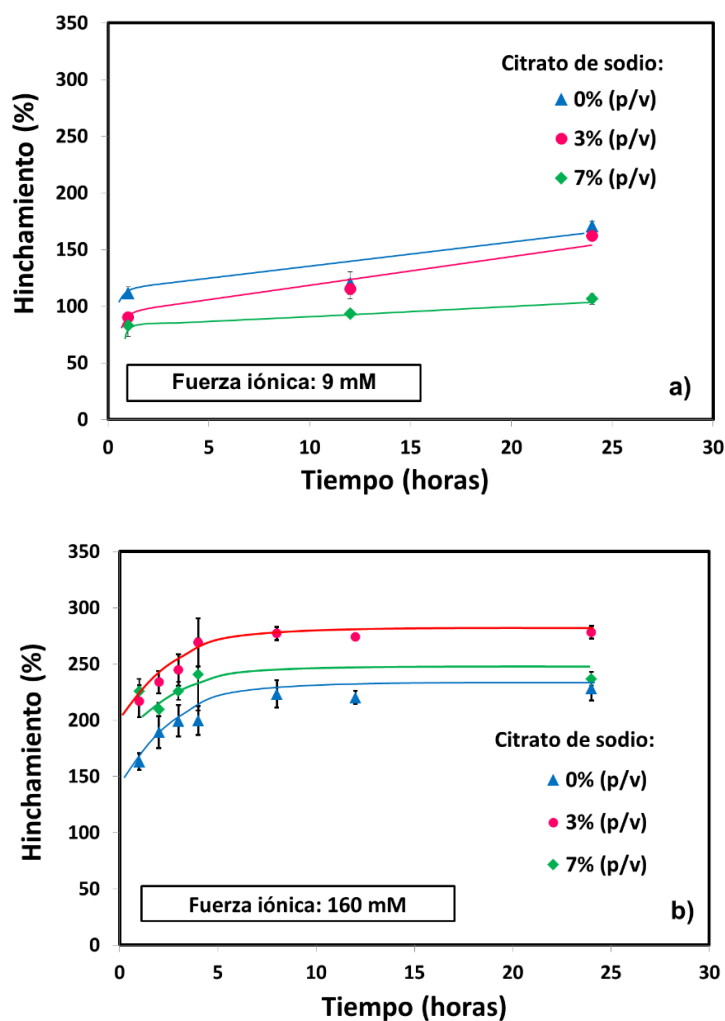


Figura 5.9. Capacidad de hinchamiento de los hidrogeles no entrecruzados y entrecruzados (3% y 7% (p / v) de citrato de sodio) en solución de PBS a pH 7,4 y a diferentes fuerzas iónicas: (a) baja fuerza iónica (9 mM) y (b) alta fuerza iónica (160mM). Los ensayos se realizaron a 37°C.

Tabla 5.2. Cantidad de citrato de sodio presente en los hidrogeles tratados con 7% (p/v) de citrato de sodio y cantidades liberadas de citrato sodio desde los hidrogeles luego de la inmersión durante 24 h en PBS a baja fuerza iónica y a alta fuerza iónica. Las determinaciones se realizaron mediante HPLC.

Hidrogel tratado con citrato de sodio (7%p/v)		
Citrato de sodio presente en el hidrogel (mg/ g hidrogel)	Citrato de sodio liberado a baja fuerza iónica (9 mM) (mg/ g hidrogel)	Citrato de sodio liberado a alta fuerza iónica (160 mM) (mg/ g hidrogel)
58,2	26,9	56,2

La **Tabla 5.3** muestra los valores de solubilidad de los hidrogeles no entrecruzados y entrecruzados luego de sumergirlos en estas soluciones de PBS. Los valores de solubilidad para todos los hidrogeles rondaron entre un 11-18% y entre 19-22%, para una baja y alta fuerza iónica, respectivamente. Esto indica que la solubilidad de todos los hidrogeles se incrementó con el aumento de la fuerza iónica del medio líquido.

Particularmente, a alta fuerza iónica los hidrogeles no tratados liberaron impurezas y oligómeros al medio líquido. Mientras que, los hidrogeles entrecruzados además liberaron citrato de sodio (56,2 mg/ g hidrogel), indicado por los resultados obtenidos de HPLC (**Tabla 5.2.**), el cual corresponde a un 5,62 % del material. Por lo tanto, debido a que los valores de solubilidad entre los diferentes hidrogeles entrecruzados y no entrecruzados fueron similares entre sí para cada una de las fuerzas iónicas evaluadas, se puede decir que de alguna manera el agente de entrecruzamiento contribuye a mantener la estructura del hidrogel.

Tabla 5.3. Solubilidad de los hidrogeles no tratados y tratados con diferentes concentraciones de agente de entrecruzamiento (citrato de sodio 3 y 7 % (p/v)), luego de sumergirlos en solución de PBS a distintas fuerzas iónicas y a pH 7,4 durante 24 h.

Tratamiento con citrato de sodio % (p/v)	Baja fuerza iónica (9 mM) (%)*	Alta fuerza iónica (160 mM) (%)*
0	13,5 ± 1,1	21,7 ± 0,8
3	11,6 ± 1,9	19,6 ± 1,4
7	17,7 ± 0,6	21,2 ± 0,3

(*) Se informa las desviaciones estándar del promedio de cinco réplicas del ensayo.

b) Efecto del pH

La **Figura 5.10** muestra la capacidad de hinchamiento en función del tiempo de los hidrogeles no entrecruzados y entrecruzados luego de sumergirlos en solución de HCl 0,01 N a pH 2,0 y fuerza iónica de 160 mM ajustado con NaCl.

Se observa que la capacidad de hinchamiento de todos los hidrogeles aumentó significativamente al cambiar el pH del medio líquido de 7,4 a 2,0. En particular para el hidrogel no tratado el aumento del hinchamiento fue de 220% a 450% al aumentar la acidez del medio líquido. Este resultado se debe a que, a pH más ácido, los grupos aminos libres pertenecientes a las cadenas de quitosano se encuentran totalmente ionizados y por lo tanto la repulsión de los mismos, genera un aumento en la capacidad de hinchamiento por la entrada de agua junto con los contraiones para neutralizar las nuevas cargas presentes (Berger y col. 2004).

En este caso también, la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles tratados aumentó porque al disminuir el pH, las interacciones entre los grupos aminos del Q y los grupos ácidos del citrato y del xilano se debilitan y por lo tanto facilita el hinchamiento del hidrogel (Shu y col. 2001). Particularmente, el hidrogel tratado con solución de citrato al 7% (p/v) alcanzó un valor de hinchamiento del 500% luego de las 24 h de inmersión y, además, mantuvo su integridad sin disolverse.

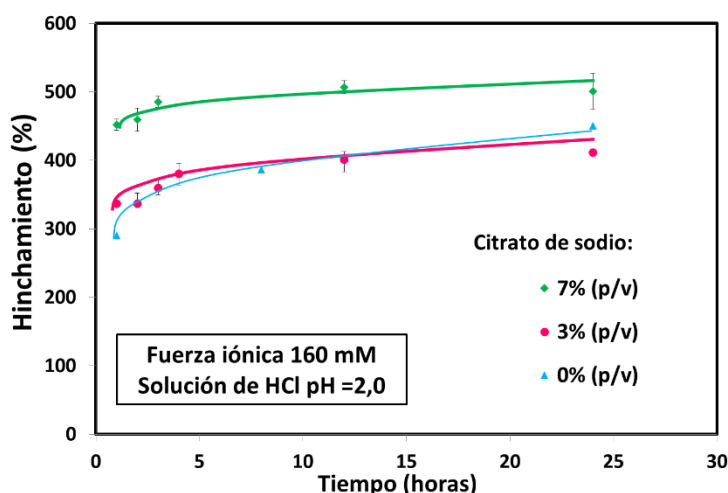


Figura 5.10. Hinchamiento de hidrogeles no tratados y tratados (3% y 7% (p/v) de citrato de sodio) en solución de HCl 0,01 N a pH 2,0 y a 37°C.

La **Tabla 5.4** muestra la solubilidad de los hidrogeles luego de sumergirlos en solución de HCl a pH 2,0 y a alta fuerza iónica (160 mM) durante 24 horas. Los resultados muestran que la solubilidad de los hidrogeles no tratados disminuyó cuando el pH del medio líquido se cambió de 7,4 a 2,0 (21,7% a 9,5 %). En cambio, los hidrogeles tratados presentaron mayores valores de solubilidad a pH 2,0 en comparación con los hidrogeles no tratados, este aumento podría deberse principalmente a la liberación del citrato de sodio presente en los mismos.

Tabla 5.4. Solubilidad de los hidrogeles no tratados y tratados con diferentes concentraciones de agente de entrecruzamiento (citrato de sodio 3 y 7 % (p/v)), luego de sumergirlos en solución de HCl a pH 2,0 durante 24 h y a 37 °C.

Tratamiento con citrato de sodio % (p/v)	Alta fuerza iónica (160 mM) (%)*
0	9,5 ± 2,7
3	16,0 ± 0,9
7	18,2 ± 0,9

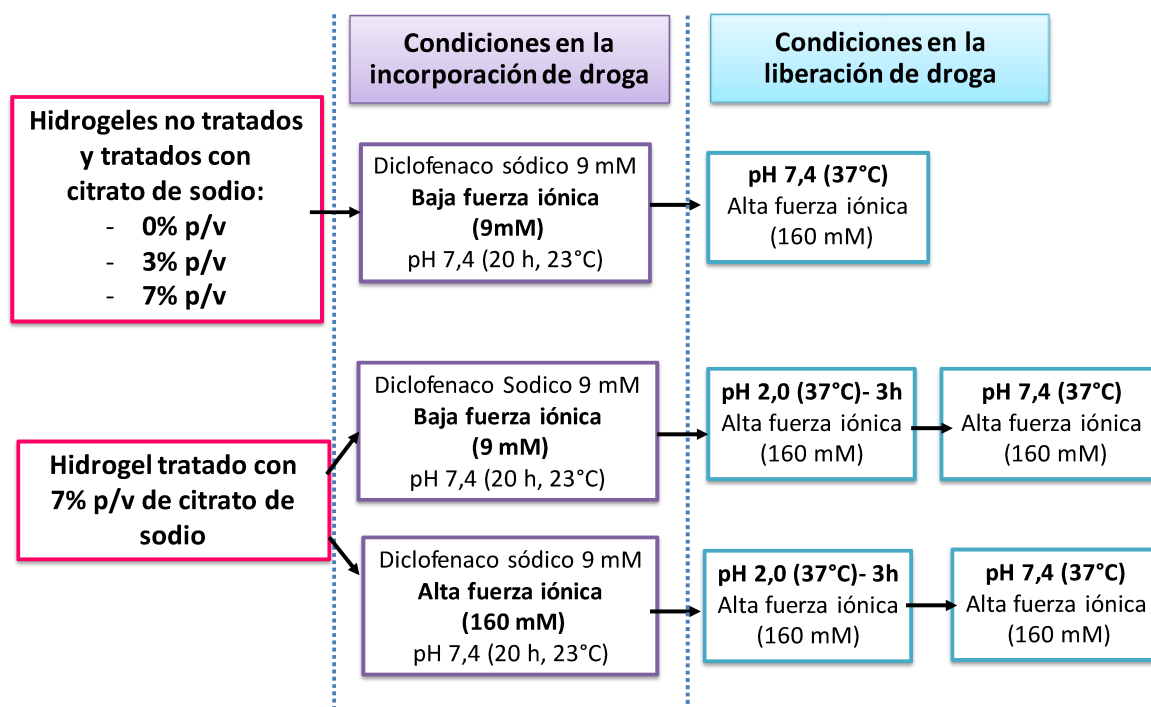
(*) Se informan las desviaciones estándar del promedio de cinco réplicas del ensayo.

5.4.2. Evaluación de los hidrogeles como sistema para la liberación controlada de droga

El **esquema 5.1.** resume las condiciones utilizadas para incorporar y liberar el principio activo. Se utilizaron para este ensayo los hidrogeles tratados con diferentes concentraciones de agente de entrecruzamiento (0%, 3% y 7% (p/v)), los cuales se sumergieron en la solución de diclofenaco sódico (9 mM) durante 20 h a 23°C. Seguidamente se estudió el proceso de liberación de droga en solución de PBS a pH 7,4.

En el esquema también se muestran las condiciones de dos experimentos realizados para evaluar el efecto de la fuerza iónica utilizada en la incorporación del principio activo (9 y 160 mM fuerza iónica) y el efecto del pH en la liberación de la droga. Para esto se utilizaron los hidrogeles tratados con 7% p/v citrato de sodio. El estudio del efecto del pH se realizó con el fin de simular una administración oral del fármaco a partir del hidrogel entrecruzado (7% p/v de citrato de sodio). Para ello, los hidrogeles cargados con el principio activo se colocaron en solución de HCl pH 2,0 (el cual está relacionado con

un valor representativo del pH del estómago), a 37 °C durante 180 min. Luego, el hidrogel se retiró y se sumergió en solución PBS a pH 7,4 (relacionado con un valor representativo del pH del colon). Todos los experimentos se realizaron por duplicado.



Esquema 5.1. Condiciones utilizadas en la incorporación y en la liberación del principio activo en los hidrogeles tratados con diferentes concentraciones citrato de sodio (0%, 3% y 7% (p / v)). Experimentos adicionales sobre el hidrogel tratado (7% (p/v) citrato de sodio), de manera de simular una administración oral, se estudió la liberación a pH 2,0 (relacionado al valor del pH del estómago) seguido de una liberación a pH 7,4 (relacionado al pH del colon). Además, se evaluó el efecto de la fuerza iónica en la incorporación de la droga (9 mM y 160 mM).

- Incorporación del principio activo

La **Tabla 5.5** muestra la cantidad total de fármaco incorporado en los hidrogeles entrecruzados y no entrecruzados, luego de la inmersión en solución de diclofenaco sódico (9 mM) a pH 7,4 durante 20 h. Se observa que la cantidad incorporada en el hidrogel no tratado fue de 19 mg/g de película (0,06 meq DS/ g película). Pero para el hidrogel tratado (7% p/v de citrato de sodio) la cantidad de principio activo incorporado fue significativamente mayor 255 mg/g película (0,80 meq DS/ g película).

La drástica diferencia en la capacidad de incorporar el principio activo de los hidrogeles no entrecruzados y entrecruzados se puede atribuir a que las estructuras de los hidrogeles son marcadamente diferentes antes del proceso de incorporación del fármaco.

En los hidrogeles no entrecruzados, iones acetato de bajo peso molecular (59 g/mol) que presentan un solo grupo ionizado actúan como contraiones. En cambio, en los hidrogeles entrecruzados, los contraiones son principalmente iones citrato de mayor peso molecular (212 g/mol), los cuales a pH 7,4 presentan casi tres grupos funcionales ionizados. Estos grupos citratos son los que producen el entrecruzamiento y permiten obtener una matriz polimérica más resistente y marcadamente diferente.

La tabla también muestra los resultados de HPLC realizados para determinar la cantidad de citrato liberado durante el proceso de incorporación del principio activo. Sabiendo que la cantidad inicial de citrato de sodio en la película fue de 58,2 mg/g película (como fue mostrado en la Tabla 5.2), se observa que la cantidad de citrato de sodio liberado desde el hidrogel entrecruzado (7% p/v de citrato de sodio) fue total.

Por otro lado, considerando la cantidad de equivalentes del fármaco absorbido en el hidrogel tratado (7% p/v de citrato de sodio) (0,80 meq/g de película) y la cantidad de equivalentes de citrato de sodio liberado del mismo hidrogel (0,67 meq/g de película), se puede concluir que el fenómeno de intercambio iónico domina el proceso de absorción del fármaco. Además, si calculamos los grupos aminos libres teóricos presentes en el hidrogel (0,93 meq/g de película), se observa que la cantidad de equivalentes del principio activo incorporados es similar a la cantidad de equivalentes presentes en el hidrogel.

Tabla 5.5. Cantidad de diclofenaco sódico absorbido en los hidrogeles no tratados y tratados con citrato de sodio y cantidad de citrato de sodio liberado durante el proceso de incorporación de droga desde el hidrogel tratado (determinado por HPLC). Los equivalentes teóricos libres del hidrogel no tratado son 0,93 meq/g.

Tratamiento con citrato de sodio (% p/v)	Cantidad de droga incorporada en el hidrogel (mg/g película) ^(a)	Citrato de sodio liberado desde el hidrogel (mg/g película) ^(a)
0	19 ± 6 (0,06 meq/g película)	--
3	239 ± 2 (0,75 meq/g película)	nd ^(b)
7	255 ± 5 (0,80 meq/g película)	58,1 (0,60 meq/g película) ^(c)

(a) Resultados expresados en mg/g de película y también en meq/g de película.

(b) No determinado

(c) Para el cálculo se consideraron dos equivalentes de citrato de sodio.

La **Figura 5.11** muestra un hidrogel no tratado y uno tratado con citrato de sodio y cargado con la droga. Se observa que el hidrogel tratado está más opaco por la incorporación de la droga.

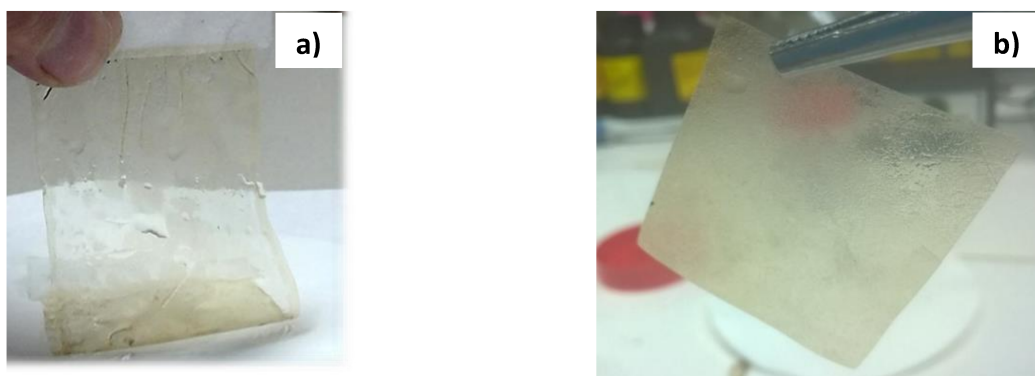


Figura 5.11. Fotografías de a) hidrogel no tratado y b) hidrogel tratado con solución de citrato de sodio al 7% (p/v) luego de realizar el proceso de incorporación del diclofenaco sódico a una concentración de 9 mM y pH 7,4.

- Liberación del principio activo

La **Figura 5.12** muestra la cantidad de fármaco liberado en solución de PBS (160 mM) a pH 7,4 y 37°C en función del tiempo luego de sumergir los hidrogeles que fueron cargados previamente por inmersión en solución 9 mM DS. Para el hidrogel no entrecruzado, se puede observar un fenómeno de liberación explosiva. Este fenómeno a menudo se considera como un efecto negativo, debido a que las altas velocidades de liberación iniciales pueden causar toxicidad local o sistémica (Jeong y col. 2000) y pueden ser económicamente ineficientes (Huang y Brazel 2001).

Varios investigadores han explicado las posibles razones que pueden conducir a una liberación explosiva. Batycky y col. (1997) evaluaron la liberación de fármacos atrapados en microesferas de poli (ácido D, L-láctico-co-glicólico (PLGA)). Ellos sugirieron que el fármaco se liberó de inmediato debido a que solo quedó atrapado en la superficie de la matriz polimérica. Por otro lado, Cursaru y col. (2013) atribuyeron la liberación explosiva del fármaco a la estructura porosa de los hidrogeles utilizados, que se obtuvieron mediante la reacción de poli (etilenglicol) terminados con diepoxi y poliaminas.

En nuestro caso, la liberación explosiva del fármaco a partir de los hidrogeles no entrecruzados podría deberse a la débil interacción entre el fármaco y el hidrogel durante el proceso de incorporación de la droga. Este comportamiento podría producir una adsorción superficial del fármaco. Otra razón podría ser la estructura porosa superficial del hidrogel, como se mostró anteriormente en las imágenes SEM.

Por otro lado, en la **Figura 5.12** también se puede observar una liberación del diclofenaco sódico controlada cuando se evaluaron los hidrogeles tratados con 3% y 7% (p/v) de citrato de sodio. A pesar que aproximadamente el 43% del fármaco inicial absorbido se liberó en los primeros 5 minutos en los hidrogeles tratados con 3% y 7% (p/v), el principio activo restante se liberó de forma controlada hasta alcanzar una meseta a los 60 minutos. Este comportamiento puede justificarse por una interacción iónica mayor entre el fármaco y el hidrogel durante el proceso de carga de la droga. El proceso requiere en este caso, la difusión de las sales del PBS hacia el interior del hidrogel, donde tendrá lugar el intercambio iónico y finalmente la salida de la droga por difusión. Por lo tanto, el tratamiento con citrato de sodio es esencial para mejorar el sistema de administración del principio activo.

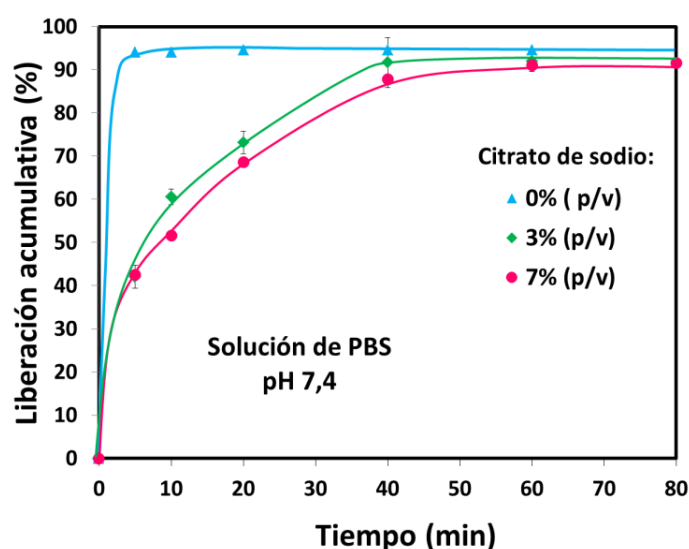


Figura 5.12: Liberación de diclofenaco sódico en solución PBS a pH 7,4 y 37 °C de los hidrogeles tratados con diferentes concentraciones de agente de entrecruzamiento al 0%, 3% y 7% (p/v) de solución de citrato de sodio, previamente inmersos en solución 9 mM de DS durante 20 h.

5.4.3. Efecto de la fuerza iónica y el pH en el proceso de incorporación y liberación del principio activo sobre el hidrogel tratado con 7% p/v citrato de sodio

- Incorporación del principio activo

La **Tabla 5.6** muestra la cantidad de diclofenaco sódico en los hidrogeles tratados con citrato de sodio (7% p/v) y a dos fuerzas iónicas (9 y 160 mM). Se observa que cuando la fuerza iónica de la solución de diclofenaco sódico se aumentó de 9 mM a 160 mM, la cantidad total del principio activo incorporado en el hidrogel tratado disminuyó notablemente. Esta pérdida en la capacidad para incorporar el principio activo, puede deberse a que se debilitan las interacciones iónicas por apantallamiento y disminuye el ingreso del principio activo. El citrato de sodio presente en el hidrogel se liberó completamente a ambas fuerzas iónicas.

Tabla 5.6. Cantidad de diclofenaco sódico absorbido en el hidrogel entrecruzado (7% p/v de citrato de sodio) a dos fuerzas iónicas (9 y 160 mM).

Fuerza iónica (mM)	Cantidad de droga incorporada (mg/g película)*	Citrato de sodio liberado desde el hidrogel (mg/g película) ^(a)
9	255 ± 5	58,1 ^(b)
160	52 ± 4	58,0 ^(b)

(a) Resultados expresados en mg/g de película.

(b) Para el cálculo se consideraron dos equivalentes de citrato de sodio.

- Liberación del principio activo

La **Figura 5.13** muestra la liberación del diclofenaco sódico del hidrogel tratado (7% p/v de citrato de sodio) a dos valores diferentes de pH de manera de simular una administración oral. Además, se consideraron las dos fuerzas iónicas en la etapa de incorporación del principio activo 9 mM y 160 mM. La figura muestra que cuando la droga se incorporó a baja fuerza iónica (9 mM), la cantidad liberada del fármaco a pH 2,0 fue muy baja (2%) probablemente porque el diclofenaco sódico no es soluble en estas condiciones del medio líquido. Luego se puede observar que cuando el hidrogel se colocó en solución de PBS a pH 7,4, el fármaco se liberó de forma controlada de manera similar a la curva obtenida en la **Figura 5.12**. Por lo tanto, se puede concluir que este tipo de hidrogel podría

utilizarse en la administración oral de este fármaco disminuyendo algunos de sus principales efectos adversos como las úlceras en el estómago y sangrado gastrointestinal.

En cambio, cuando la incorporación de la droga se realizó a alta fuerza iónica (160 mM), la cantidad de fármaco liberada a pH 2,0 fue mayor, pero de todas maneras fue un porcentaje muy bajo de liberación (aprox. 10%). Además, se observa que la liberación a pH 7,4 fue mucho menos controlada que para la curva correspondiente a la incorporación de droga a baja fuerza iónica. Este resultado sugiere que existe, en este caso, una interacción iónica débil entre el fármaco y el hidrogel, debido a la alta concentración de sales presentes en el proceso de carga que impiden la interacción iónica con los grupos aminos del Q.

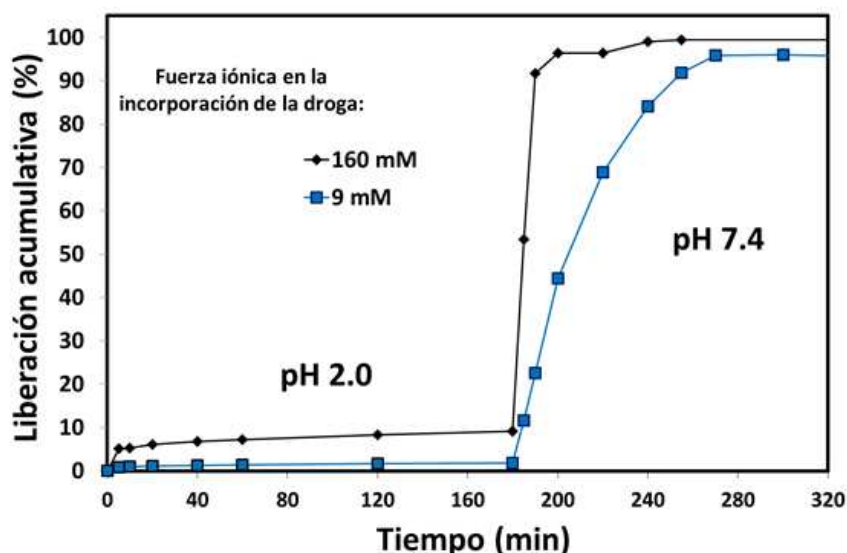


Figura 5.13. Liberación de diclofenaco sódico a partir del hidrogel entrecruzado con citrato de sodio en función del tiempo. Primera etapa: a pH 2,0 durante 180 min, y segunda etapa: a pH 7,4 durante 100 min. La incorporación del principio activo se realizó a una concentración de droga de 9 mM y fuerza iónica 9 mM.

La **Figura 5.14** muestra un hidrogel sumergido en solución a pH 2,0. Se destaca el hecho de que el hidrogel mantuvo su integridad física.

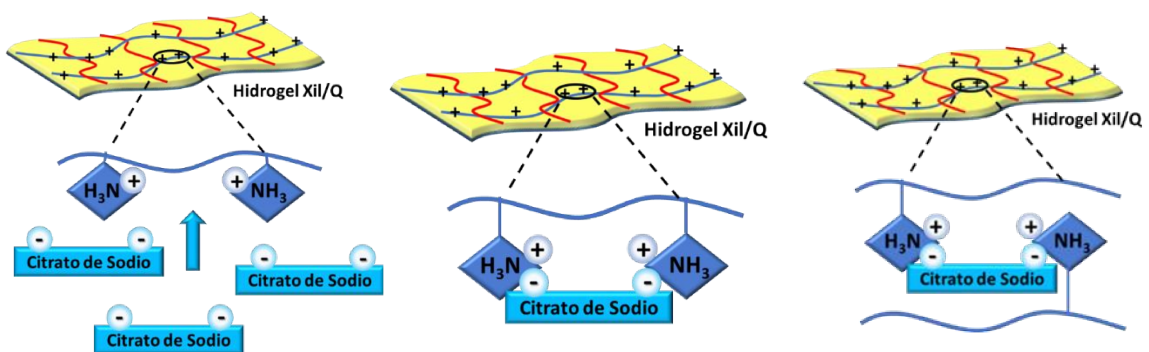


Figura 5.14. Hidrogel tratado con solución de citrato de sodio (7 % p/v) y cargado con diclofenaco sódico, luego de sumergirlo en solución de HCl a pH 2,0 y a 37°C.

5.4.4. Mecanismo propuesto de incorporación y liberación de la droga

ETAPA 1): Tratamiento con el agente de entrecruzamiento iónico

En la primera etapa durante el tratamiento de los hidrogeles con solución del agente de entrecruzamiento a pH 5,0, los grupos aminos libres del Q (que no se encuentran en interacción con los grupos carboxílicos del xilano) se encuentran en su forma ionizada pudiendo interactuar con los grupos carboxilos del citrato de sodio. Esta interacción puede ocurrir de dos maneras: **a)** los grupos iónicos del citrato de sodio interactúan con dos grupos aminos pertenecientes a una misma cadena de Q y **b)** los grupos iónicos del citrato de sodio interactúan con dos grupos aminos pertenecientes a dos cadenas diferentes de Q, fenómeno el cual implica entrecruzamiento iónico.



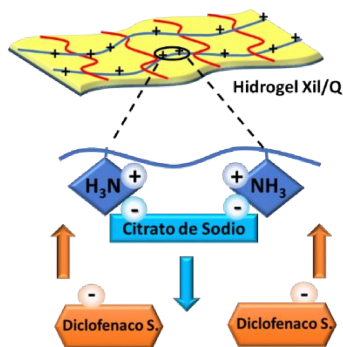
Tratamiento con el agente de entrecruzamiento iónico a pH 5,0 y a 5°C.

a) Interacción iónica del citrato de sodio con dos grupos aminos pertenecientes a la misma cadena de Q.

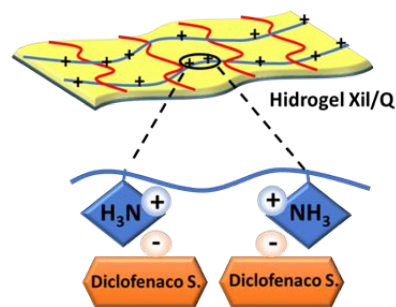
b) Entrecruzamiento iónico dado por la interacción del citrato de sodio con dos grupos aminos pertenecientes a dos cadenas distintas de Q.

ETAPA 2): Proceso de incorporación del principio activo

En la segunda etapa, el hidrogel que se encuentra entrecruzado iónicamente con el citrato de sodio se coloca en solución de diclofenaco sódico a pH 7,4 (este pH se seleccionó debido a la solubilidad del principio activo). Durante este proceso, el citrato de sodio se libera al medio líquido, permitiendo la incorporación e interacción del principio activo con el hidrogel, mediante un intercambio iónico.



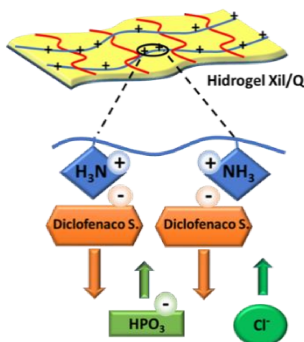
Inmersión del hidrogel en solución del principio activo a pH 7,4.



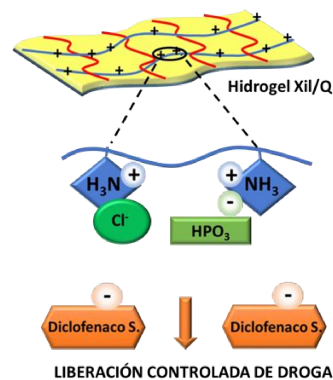
Interacción iónica entre los grupos aminos del Q y los grupos ácidos del principio activo, luego del intercambio iónico.

ETAPA 3): Liberación del principio activo

Por último, se produce una liberación controlada del principio activo en solución de PBS (160 mM) a pH 7,4. Posiblemente la liberación del principio activo ocurra debido también a un intercambio iónico con los iones fosfatos y cloruros presentes en el medio líquido.



Inmersión del hidrogel en una solución del PBS a pH 7,4.



Liberación del principio activo mediante un mecanismo de intercambio iónico.

5.4.5. Efecto del secado y del tamaño del hidrogel en la liberación del principio activo

- Liberación del principio activo

En la **Figura 5.15** se muestra la liberación del diclofenaco sódico de los hidrogeles tratados (7% p/v citrato de sodio) que fueron secados y cortados a mano luego del proceso de carga. Se considera la liberación en solución de HCl a pH 2,0 y en PBS a pH 7,4 en función del tiempo.

Se puede observar que a pH 2,0 los hidrogeles cortados y secados prácticamente no liberan el diclofenaco sódico, de igual manera como ocurre con el hidrogel de mayor tamaño. Luego la liberación a pH 7,4 del diclofenaco de sódico desde el hidrogel de menor área fue levemente mayor a la del hidrogel de mayor área. Se observa además que el % de liberación acumulativa final del hidrogel cortado fue de un 60%, esto puede deberse a una pérdida de masa durante el proceso de cortado.

Por lo tanto, estos resultados muestran que el secado y la reducción del área del hidrogel no afectan al comportamiento del mismo en la cinética de liberación del diclofenaco sódico. Para la aplicación de estos hidrogeles en la liberación de drogas por vía oral debe considerarse el secado del mismo ya cargado con la droga y además la reducción de su tamaño por corte o molienda, para su incorporación en un comprimido o cápsula.

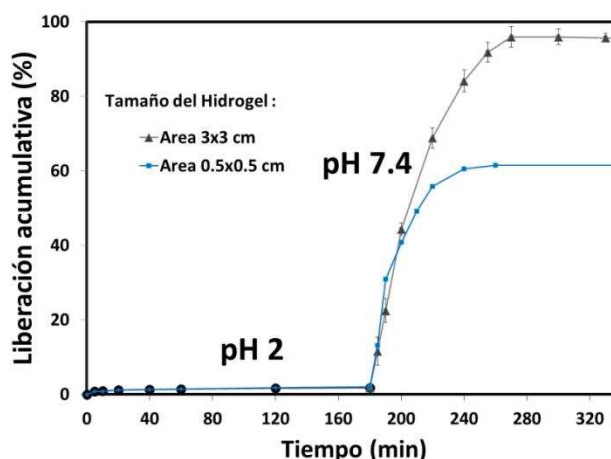


Figura 5.15. Liberación de diclofenaco sódico de los hidrogeles tratados en función del tiempo. Primera etapa: a pH 2,0 durante 180 min, y segunda etapa: a pH 7,4 durante 100 min. Se

consideraron dos tamaños diferentes de los hidrogeles y un secado previo al estudio *in vitro* del proceso de liberación.



Figura 5.16. Hidrogel tratado y cargado con diclofeanaco sódico en solución de HCl a pH 2,0 y a 37 °C. (Área 0,25 cm²).

5.5. CONCLUSIONES PARCIALES

El método propuesto basado en la formación controlada de complejos de polielectrolitos de Xil/Q con altas cantidades de xilano a pH 5,0 permitió obtener hidrogeles sensibles al pH con resistencia mecánica y flexibilidad que permitieron su fácil manipulación.

El tratamiento de los hidrogeles con el agente de entrecruzamiento iónico mejoró notoriamente las propiedades mecánicas en húmedo.

La capacidad de hinchamiento de los hidrogeles depende de las condiciones del medio líquido. Particularmente, cuando los hidrogeles entrecruzados (7% p/v citrato de sodio) fueron inmersos en solución de alta fuerza iónica (160 mM) y a pH 7,4, la capacidad de hinchamiento claramente aumentó y el citrato de sodio fue liberado casi completamente al medio líquido. Un aumento aún mayor en la capacidad de hinchamiento se observó cuando el hidrogel tratado fue inmerso en solución a alta fuerza iónica y pH 2,0 debido a la ionización y a la repulsión entre las cargas de los grupos aminos presentes en las cadenas del quitosano.

La cantidad de diclofenaco sódico incorporado en el hidrogel no entrecruzado fue baja y su liberación fue explosiva, indicando la presencia de una leve interacción entre el hidrogel y el principio activo. Por otro lado, los hidrogeles entrecruzados con citrato de sodio, incorporaron una cantidad comercialmente aceptable de diclofenaco sódico y

liberaron a éste de manera más controlada. Estos resultados sugieren que el tratamiento con citrato de sodio es esencial para mejorar la capacidad de los hidrogeles de Xil/Q como sistemas para la liberación controlada de droga. La aceptable incorporación y liberación controlada puede ser explicada por un mecanismo de intercambio iónico.

Por otro lado, los resultados mostraron que es conveniente utilizar una baja fuerza iónica en el proceso de incorporación del principio activo ya que, el mismo es altamente afectado por la presencia de alta concentración de sales.


Además, el hidrogel con citrato de sodio mostró la capacidad de mantener su integridad física y retener al diclofenaco sódico a pH 2,0. Seguidamente, el hidrogel liberó la droga de manera controlada en solución de PBS pH 7,4. Esto sugiere, que el hidrogel entrecruzado puede ser utilizado para la administración oral del diclofenaco sódico.

Los resultados sugieren que estos hidrogeles biodegradables tienen una aplicación potencial para la administración de fármacos aniónicos.



CAPÍTULO 6

ADSORCIÓN DE COMPLEJOS DE
POLIELECTROLITOS SOBRE FIBRAS
RECICLADAS PARA LA MEJORA DE
PROPIEDADES PAPELERAS



6.1. INTRODUCCIÓN

En la producción industrial del papel, el reciclado de los papeles de desperdicio resulta indudablemente deseable desde el punto de vista ambiental y socio-económico ya que:

- Implica la preservación de recursos forestales (una tonelada de pulpa virgen seca equivale a más de cuatro toneladas de árbol vivo).
- Representa una disminución en el volumen de desechos destinados al relleno de terrenos y una reducción en la quema de los mismos.
- La inversión global necesaria para producir papel a partir de recortes, es sensiblemente menor a la necesaria para producir papel a partir de madera, teniendo en cuenta el requerimiento de energía de las plantas de papel reciclado. El proceso es más simple, principalmente mecánico, sin presión, sin temperaturas elevadas y con bajo consumo de productos químicos.
- Las emisiones ambientales de dióxido de carbono, óxidos de azufre, óxido de nitrógeno y partículas son muy inferiores a las emitidas por una planta *kraft*. Una planta *kraft* emite 2,6 - 3,1 toneladas de dióxido de carbono por cada tonelada de pulpa producida.

En la producción de papeles para cartón corrugado se utiliza una importante cantidad de fibras recicladas. El cartón corrugado está constituido por papel tapa (*liner*) y papel onda. Dentro de los papeles tapa se distingue el "*kraft liner*" con alto porcentaje de pulpa virgen (más de 80%) y el "*test liner*" fabricado con fibras recicladas. Las pulpas vírgenes típicas utilizadas para producir papel tapa "*kraft liner*" marrón son pulpas *kraft* de coníferas no blanqueadas.

Las propiedades de resistencia más importante del papel tapa es la resistencia a la tracción, la energía absorbida en el ensayo de tracción (TEA). Interesa también la resistencia a la compresión en dirección transversal del papel (resistencia a la compresión de canto del anillo, Ring Crush Test, RCT). El desarrollo de una incipiente resistencia en húmedo puede ser útil para

inferir un mejor comportamiento en condiciones de mayor humedad a las condiciones estándar de ensayo (50 %HR). El gramaje del papel tapa es de 90-100 g/m².

Para el papel onda, la resistencia a la compresión de la onda, *Concora Medium Test* (CMT), es la propiedad más importante. Interesa también la resistencia a la compresión de canto de la onda (*Corrugating Compression Test*, CCT) ya que es el esfuerzo que soporta en las paredes laterales de la caja de cartón corrugado. Estas propiedades dependen de la rigidez del papel y del comportamiento del papel en la operación de corrugado. El rango de gramaje del papel onda es de 112-180 g/m².

El principal problema del papel reciclado es que presenta menor resistencia que el papel virgen. Esto se debe a que en las distintas etapas del proceso de reciclado (desintegración del papel o cartón, acondicionamiento de las fibras, formación del nuevo papel, prensado y secado, entre otras) se producen cambios físicos y químicos de las fibras.

Diversos autores han mostrado que la pérdida de la flexibilidad en húmedo y la inactivación superficial de las fibras recicladas son unas de las causas por las cuales se produce una pérdida de las propiedades de resistencia del papel reciclado (Nazhad y Paszner 1994; Gurnagul y col. 2001). Durante el secado, los poros de la pared de las fibras se cierran, y no tienen la capacidad de volver a abrirse cuando las fibras son rehidratadas (Nazhad y Paszner 1994). Esto conduce a una menor conformabilidad de las fibras, reduciéndose así el área de enlace relativa (RBA) entre las mismas.

También en el secado, muchas fibrillas externas se unen o pegan a la propia fibra, disminuyendo así su posibilidad de formar enlaces. Además, en esta etapa, se observan cambios en la morfología de las fibras. Hay una disminución del espesor de pared y el área transversal de las fibras, los lúmenes de las fibras sufren un colapso y se observan cambios como enrutado (*curl*) y quiebres (*kinks*). Se podría esperar también que algunos químicos utilizados en la etapa de destintado aún permanezcan en las fibras recicladas (ácidos grasos, surfactantes no iónicos,

dispersantes). Además, las tintas hidrofóbicas que permanecen unidas a las fibras disminuyen la energía superficial (Etzler y col. 1995).

El refino mecánico es un recurso tradicionalmente aplicado para la recuperación de sus propiedades. No obstante, la baja drenabilidad de la pulpa reciclada es adicionalmente reducida por la nueva generación de finos durante el refino. Una baja drenabilidad de la pulpa implica una menor velocidad de la máquina papelera (menor producción) y una menor calidad en la formación.

Otra alternativa de mejora de propiedades es mediante el agregado de aditivos químicos. En la industria papelera se utilizan comúnmente aditivos como los almidones catiónicos y las poliacrilamidas para aumentar la resistencia específica de enlace de estos papeles.

Las empresas internacionales de productos químicos para la industria papelera (ej.: BASF, Buckman, Kemira, etc.) están permanentemente ofreciendo nuevos aditivos sintetizados específicamente para este fin. Muchos de ellos son seleccionados porque generan bajo impacto ambiental, o son permitidos por la FDA, reglamento Mercosur, normas alemanas, etc. para su uso en papeles que van a estar en contacto con alimentos.

Una alternativa para aumentar considerablemente la resistencia de los papeles se basa en utilizar la técnica de formación de una doble capa (Hubbe y col. 2003; Galván y col. 2013) o multicapas sobre las fibras (Wågberg y col. 2002, Eriksson y col. 2006) que consiste en la adsorción consecutiva de polielectrolitos de carga opuesta para crear heteroestructuras. Otra opción consiste en preformar complejos de polielectrolitos (PECs), para que luego interactúen con las fibras (Fatehi y col. 2010; Chollakup y col. 2013; Ondaral y col. 2018). Esta alternativa, comparada con el sistema dual, presenta la ventaja de que, además de lograr mejoras en las propiedades del papel, es más simple y escalable a nivel industrial ya que requiere menor consumo de agua y menor necesidad de capital instalado (Ankerfors 2008). Particularmente, Heerman y col. (2006) encontraron que la resistencia a la tracción en seco del papel aumentó considerablemente, al depositar cantidades extremadamente altas de pDADMAC y CMC (carboximetilcelulosa) (hasta un 40% PECs / pulpa seca) sobre fibras *kraft* blanqueadas. Los

polielectrolitos se agregaron secuencialmente sobre las fibras o se pre-formaron antes de su interacción con las mismas.

Estudios previos propios demostraron que el uso de PECs de PAH/PAA, en lugar de polielectrolitos simples como el poli (clorhidrato de alilamina) (PAH), permite alcanzar cantidades mayores de retención del aditivo catiónico sobre fibras *kraft* no blanqueadas. Por ejemplo, cuando se agregó un dosaje de 1,4% de PEC de PAH/PAA sobre pulpa (del cual el 1,1 % corresponde a PAH), la cantidad retenida del PEC fue del 1,08% (10,8 mg PEC/g pulpa seca), (del cual el 0,85% correspondió a PAH), es decir que se retuvo un 77 % del PAH agregado. No obstante, cuando se agregó un dosaje de 0,7% de PAH solo sobre la pulpa, la cantidad retenida del PAH fue de 0,35% (3,5 mg PAH/g pulpa seca), es decir un 50% del total de PAH agregado (Galván y col. 2015).

Nuestro grupo de trabajo también ha encontrado que la combinación de polielectrolitos sintéticos y naturales como el PAH/Xilano aumentan las propiedades mecánicas de papeles marrones reciclados de alta calidad (Mocchiutti y col. 2015) los cuales se utilizan ampliamente en la producción de cartón corrugado.

Particularmente, en este trabajo de Tesis se propone utilizar dos polielectrolitos naturales para formar los PECs, el xilano y el quitosano, para mejorar las propiedades de resistencia de este tipo de papeles.

Además, para obtener una comprensión más profunda de la adsorción de estos polielectrolitos o PECs sobre superficies, se pueden utilizar las siguientes técnicas: una microbalanza de cristal de cuarzo con monitoreo de disipación (QCM-D) en conjunto con la técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR).

El QCM-D es útil para caracterizar el comportamiento de adsorción sobre la superficie de un sensor cuando se hace pasar sobre éste una corriente líquida conteniendo el compuesto que puede adsorberse. Estos sensores son delgados cristales de cuarzo que por su propiedad piezoeléctrica oscilan libremente por aplicación de un voltaje alterno. El método permite entender el proceso de adsorción y las propiedades de la capa adsorbida a nivel molecular. Los límites de

detección están en el rango de nanogramos por cm^2 . Las mediciones permiten determinar: a) la frecuencia de oscilación, la cual está relacionada con la masa de la capa unida a la superficie del sensor, b) la disipación, que está relacionada con la amortiguación de la oscilación debido a la viscoelasticidad de la capa.

Por otro lado, la resonancia de plasmones superficiales (SPR) es una técnica óptica muy sensible que también ha sido muy utilizada para analizar la adsorción de biopolímeros sobre una superficie (Orelma y col. 2011; Eronen y col. 2011). El principio de detección se basa en los cambios del índice de refracción de una película metálica (sensor SPR) que ocurren cuando se adsorbe una molécula desde una corriente líquida que pasa sobre la superficie. El cambio en el índice de refracción modifica el ángulo de la luz reflejada que incide en el detector. Este ángulo se monitorea en función del tiempo y se analiza para calcular las propiedades de las capas adsorbidas (Orelma y col. 2011). El uso combinado de estas dos técnicas QCM-D y SPR permite obtener una comprensión más profunda sobre la adsorción de polielectrolitos o PECs en las superficies del sustrato.

Varios autores han utilizado un sensor de sílice para evaluar la adsorción de películas de múltiples capas de polielectrolitos (Saarinen y col. 2008; Gärdlund y col. 2003), y complejos de polielectrolitos (Ankerfors 2008; Saarinen y col. 2008) en estudios de QCM-D. Los estudios sobre superficies modelos de celulosa, xilano y lignina también han sido de interés en muchas investigaciones (Tammelin y col. 2006; Norgren y col. 2007; Saarinen y col. 2008; Peresin y col. 2012). La fibra celulósica no puede ser utilizada para estudios de interacción superficial en un nivel molecular (Tammelin y col. 2006). Por lo tanto, el desarrollo de celulosa nanofibrilar (CNF) obtenidas por tratamiento mecánico, permitió la obtención de superficies de sílice recubiertas con una capa de fibrillas, la cual tendrá cargas aniónicas.

En este capítulo inicialmente se evalúa la interacción de los CatPECs y AnPECs de Xil/Q con superficies modelos considerando su capacidad de adsorción desde el medio líquido y las características de la película adsorbida. Para ello se utiliza una microbalanza de cuarzo con control de disipación (QCM-D) y resonancia de plasmones superficiales (SPR).

Se evalúa, además, la capacidad de retención de los CatPECs y AnPECs sobre una pulpa celulósica no blanqueada química reciclada. Por último, se evalúan los efectos del agregado de estos complejos en las propiedades mecánicas referentes a papel embalaje.

6.2. MATERIALES

Se utilizó el mismo xilano y quitosano descritos y caracterizados previamente en el capítulo 3. Las soluciones de quitosano se prepararon a una concentración de 1 g/L en una solución de ácido acético de concentración 1,0% (p/v). Las soluciones de xilano se prepararon a una concentración de 2,5 g/L. Además, se utilizaron los mismos polielectrolitos sintéticos (pDADMAC y PVSK) que los utilizados en el capítulo 3.

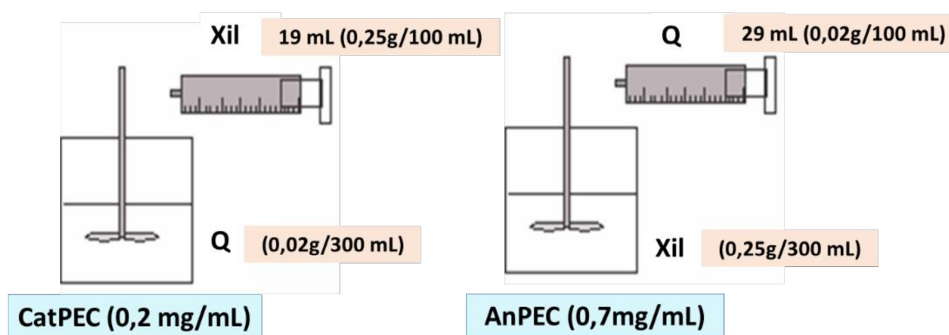
El resto de los reactivos utilizados fueron de grado pro-análisis.

6.3. MÉTODOS

6.3.1. Preparación de los complejos de polielectrolitos a pH 6,0

Los complejos catiónicos (CatPECs 30% N) y los complejos aniónicos (AnPECs 30% N) de Xil/Q con el 30% de las cargas neutralizadas, se prepararon a pH 6,0 y a una fuerza iónica de 0,01 N NaCl. El pH de formación de los complejos se seleccionó teniendo en cuenta el valor utilizado en la industria papeleras, el cual es cercano a la neutralidad.

Para la formación de los complejos se utilizó la misma técnica mencionada anteriormente en el capítulo 3, sección 3.4.1. En el **esquema 6.1** se indican las concentraciones de las soluciones utilizadas y las concentraciones finales de los complejos aniónicos y catiónicos preparados.



Esquema 6.1. Concentraciones utilizadas de los polielectrolitos Xil y Q para la obtención de complejos catiónicos CatPECs y aniónicos AnPECs a pH 6,0 y NaCl 0,01 N.

6.3.2. Caracterización de la adsorción de los complejos de polielectrolitos sobre una superficie modelo de celulosa nanofibrilar

El comportamiento de la adsorción de los PECs catiónicos y aniónicos sobre superficies modelos de celulosa nanofibrilar fue monitoreado y caracterizado utilizando una microbalanza de cristal de cuarzo con disipación (QCM-D) y la técnica de resonancia de plasmones superficiales (SPR). Las superficies con los PECs adsorbidos se observaron utilizando Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

La preparación de celulosa nanofibrilar y de las superficies modelos, así como las determinaciones con QCM, SPR y AFM, se realizaron en el Centro de Investigación Técnica (VTT), Otaniemi, Finlandia, y en la Universidad de Aalto, Finlandia, a través de una beca que me fue otorgada por PROVALOR-CYTED para realizar una estadía de investigación en el exterior.

6.3.2.1. Preparación de celulosa nanofibrilar (CNF)

Para la obtención de celulosa nanofibrilar (CNF) se utilizó papel *liner* industrial (100% de fibras vírgenes de coníferas) de *Pinus elliotii* y *Pinus taeda* suministrados por Papel Misionero S.A. (Argentina). Este papel es el mismo que se utilizó luego para determinar la cantidad de CatPECs y AnPECs retenidos en las fibras celulósicas y evaluar el efecto sobre las propiedades papepeleras.

La pulpa fue procesada mecánicamente utilizando un molino Masuko (tres pasadas) seguido por una desintegración en un microfluidizador (Microfluidics Int., CO, EE. UU.), en el cual se realizaron 20 pasadas del material. Las CNF obtenidas mecánicamente tienen la ventaja de mantener la composición química y la morfología fibrilar de las fibras de la pulpa original (Ahola y col. 2008). Por lo tanto, las nanofibrillas de celulosa, así como las fibras de celulosa, tienen cargas aniónicas en las superficies. De este procedimiento se obtuvo una suspensión de CNF con una consistencia del 1,6% p/p.

6.3.2.2. Preparación de la superficie modelo de celulosa nanofibrilar (CNF)

Para la preparación de la superficie modelo de CNF, inicialmente, se tomaron 1,5 g de la suspensión con una concentración de 1,6 % (p/p) y se llevaron a un volumen de 15 mL utilizando agua Mili-Q (ultra purificada). Luego se homogenizó durante 10 minutos utilizando un homogeneizador ultrasónico (Sonics & Materials) y se centrifugó a 8800 rpm durante 2 h. Por último, se guardó el sobrenadante obtenido conteniendo celulosa nanofibrilar.

Las superficies modelo de CNF para los estudios en QCM-D y SPR se prepararon utilizando un método de recubrimiento por rotación (WS400 BNPP *Spincoater*-Laurell Technologies Corporation, PA, EE.UU.). Los sensores se limpiaron primero utilizando un ozonizador UV (BioForce Nanoscience UV / O3 Procleaner TM Ames, IA, EE.UU.). Luego se depositó en la superficie un polímero catiónico por inmersión en solución de polietilenimina (PEI) (10 mg/mL) durante 30 minutos, seguidamente se enjuago con agua Mili-Q y la superficie se secó utilizando gas nitrógeno.

Por último, se procedió al recubrimiento de la superficie con CNF. Primeramente, se gotearon 35 μ L de agua mili-Q en la superficie del soporte, que luego se dejó en rotación (15 s, 3000 rpm), seguidamente se colocaron 50 μ L del sobrenadante de la suspensión de celulosa nanofibrilar sobre el sensor y se volvió a rotar (a 3000 rpm durante 45 s). Finalmente, los sensores

se enjuagaron con agua MilliQ, se secaron con nitrógeno gaseoso y se colocaron en estufa durante 1 hora a 80 °C para evaporar el agua restante y fijar la película de CNF en el sensor.

6.3.2.3. Monitoreo de la adsorción utilizando una microbalanza de cristal de cuarzo con control de disipación (QCM-D)

Cuando se aplica un campo eléctrico alterno sobre la superficie de un sensor de QCM-D (Figura 6.1), el cristal de cuarzo que se encuentra entre dos electrodos comienza a oscilar. La frecuencia fundamental (frecuencia inicial del cristal sin muestra depositada) disminuirá con el aumento de la masa depositada en el cristal cuando se hace pasar sobre éste, a caudal constante, una corriente líquida conteniendo el compuesto que puede adsorberse. Además, la disipación de energía en cada ciclo de oscilación se puede cuantificar y se puede relacionar con las características viscoelásticas del material.

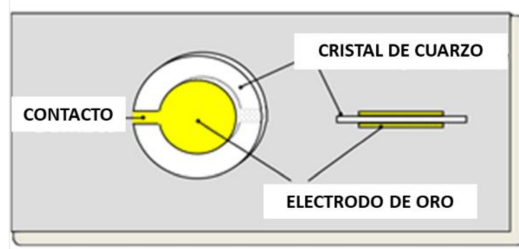


Figura 6.1. Sensor QCM se observa que el cristal de cuarzo se encuentra entre dos electrodos de oro. (Extraído de Scarano y col. 2016).

Si la capa adsorbida muestra propiedades viscoelásticas, se define un factor de disipación del sistema de oscilación como:

$$D = \frac{E_{\text{disipada}}}{2\pi E_{\text{almacenada}}}$$

Donde:

E_{disipada} : energía disipada durante un ciclo de oscilación.

$E_{\text{almacenada}}$: energía total almacenada en el sistema de oscilación.

Las mediciones obtenidas mediante QCM-D permiten determinar la cantidad de masa total hidratada durante la adsorción de los PECs sobre la superficie modelo.

Para estimar la masa adsorbida por unidad de area cuando se forma una capa viscoelástica ($\Delta D > 0$), se puede aplicar el modelo de Voight utilizando el software *QTools*. Este modelo iterativo usa ambos cambios en frecuencia y en disipación para determinar el espesor de capa adsorbida, y a partir de ella se puede determinar la masa adsorbida teniendo en cuenta los siguientes parámetros: densidad del fluido (1000 kg/m^3), viscosidad del fluido ($0,001 \text{ Kg/ms}$) y la densidad de la película se asumió constante (1200 kg/m^3).

$$\Delta m_{\text{QCM-D}} = \text{espesor} * \rho_{\text{película}} \quad (\text{Ec. 6.1})$$

Una vez preparadas las superficies modelo de CNF, se evaluó la adsorción de los CatPECs y AnPECs preparados a pH 6,0 y a una fuerza iónica de 0,01 N NaCl.

Inicialmente se midió el espesor en aire de la superficie de CNF y luego se dejó hidratar durante aproximadamente 12 h con de NaCl 0,01 N y pH 6,0 (solución de enjuague), a una corriente de flujo de $100 \mu\text{L/min}$.

Para el análisis de adsorción de los CatPECs, una vez obtenida una línea de base estable, se procedió a la inyección del PECs (50 ppm) a un caudal de $100 \mu\text{L/min}$ y a 23°C , durante 30 minutos. Luego se realizó un enjuague con solución de 0,01 N NaCl para eliminar el material débilmente unido a la superficie de celulosa nanofibrilar. El enjuague se realizó utilizando el mismo caudal utilizado durante a inyección del PECs.

Para el análisis de adsorción de los AnPECs, una vez obtenida una línea de base estable primero se inyectó solución de Q (catiónico) para obtener la carga adecuada debido a que la celulosa nanofibrilar posee cargas negativas. La solución de quitosano (50 ppm) se inyectó durante 30 minutos a un caudal de $100 \mu\text{L/min}$ y a 23°C . Luego, se realizó un enjuague con solución de NaCl y seguidamente se inyectó el AnPECs (50 ppm) durante 30 minutos y, por último, se volvió a realizar un enjuague con 0,01 N NaCl.

6.3.2.4. Monitoreo de la adsorción utilizando resonancia de plasmones superficiales (SPR)

Los experimentos de resonancia de plasmón superficial (SPR) se realizaron para poder determinar la cantidad de masa seca total adsorbida de los PECs sobre la superficie modelo de celulosa nanofibrilar utilizando un equipo Navi 200 (BioNavisOy, Ylöjärvi, Finland).

La **Figura 6.2** muestra una representación esquemática del principio de funcionamiento del equipo.

El fenómeno de resonancia de plasmones superficiales ocurre cuando una película de oro delgada semitransparente se coloca sobre un prisma y un haz de luz polarizado monocromático pasa directamente por el prisma. Cuando el haz es reflejado desde la superficie de metal bajo condiciones de reflexión interna total, los fotones del haz interactúan con los electrones libres (plasmones) de la película metálica. La interacción entre los fotones y los plasmones consume energía que puede ser observada en una caída en la intensidad de la luz reflejada. El ángulo de la luz reflejada con menor intensidad es llamado ángulo SPR. Éste es muy sensible a cualquier cambio en el índice de refracción de la película metálica cuando se adsorben moléculas sobre la superficie. El cambio en el ángulo SPR se monitorea en función del tiempo y se analiza para calcular las propiedades de las capas adsorbidas (Orelma y col. 2011).

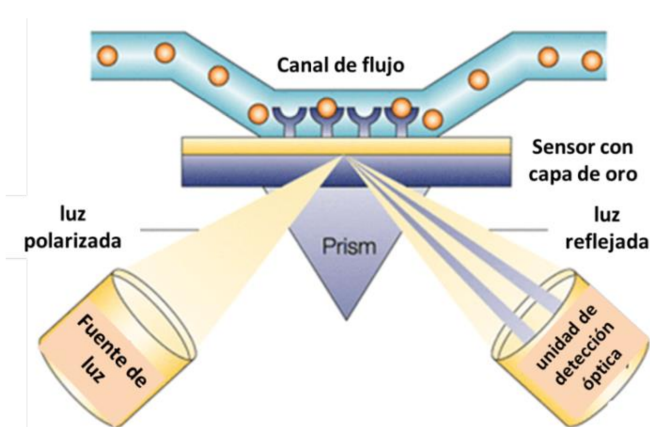


Figura 6.2. Representación esquemática del principio de funcionamiento de la resonancia de plasmones superficiales (SPR). Las moléculas adsorbidas en la superficie de oro modifican el índice de refracción de la superficie el cual se detecta con un cambio en el ángulo SPR. (Extraído de Orelma 2012)

La adsorción de los CatPECs y AnPECs preparados a pH 6,0 y fuerza iónica 0,01 N NaCl sobre la capa de CNF depositada en los sensores de SPR, se realizaron siguiendo el mismo procedimiento de inyección que el mencionado anteriormente en la **sección 6.3.2.3** (adsorción de los PECs utilizando QCM-D): inicialmente la superficie se dejó hidratar con solución de enjuague (0,01 N NaCl pH 6,0) y al obtener una línea de base se inyectó el PECs a un caudal de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ y a 23 $^{\circ}\text{C}$ y posteriormente se realizó un enjuague final.

Para determinar el espesor (d) de las capas adsorbidas de los complejos, se utilizó la **ecuación 6.2**.

$$d = \frac{l_d}{2} \frac{\Delta \text{ángulo}}{m(n_a - n_0)} \quad \text{Ec. (6.2)}$$

Donde:

Δ ángulo: es el cambio en el ángulo de SPR.

$l_d/2$: es una longitud característica del decaimiento del campo electromagnético evanescente y se estima como 0,37 de la longitud de onda de la luz.

m : es un factor de sensibilidad para el sensor (109,94 $^{\circ}$ / RIU).

n_0 : es el índice de refracción de la solución de NaCl (1,334 RIU).

n_a : es el índice de refracción del PECs adsorbido.

En este trabajo, se utilizó el índice de refracción 1,5 RIU para los PECs, correspondiente al valor del índice de refracción del Q (Granqvist y col. 2013). Por último, la masa adsorbida sobre la superficie (Δm_{SPR}) se puede calcular utilizando la **ecuación 6.3**.

$$\Delta m_{SPR} = d * \rho \quad \text{Ec. (6.3)}$$

Donde d es el espesor calculado de la capa adsorbida en nm, y ρ es la densidad específica de las moléculas adsorbidas (1,2 g / cm^3).

6.3.2.5. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Se realizó microscopía de fuerza atómica a las superficies modelos de CNF con los CatPECs y AnPECs que fueron previamente adsorbidas utilizando la técnica de QCM-D. Se utilizó

un microscopio de sonda de barrido Nimocope IIIa Multimodo (Digital Instruments Inc. Santa Barbara, CA, EE. UU.). Las imágenes se escanearon utilizando el modo “*tapping*” con un tip de silicio suministrado por IMasch (Tallin, Estonia). Las imágenes se tomaron con un tamaño de escaneo de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$.

6.3.3. Preparación de la pulpa para los estudios de retención y para la formación de hojas de ensayo

Se empleó papel *kraft liner* no blanqueado industrial (obtenido a partir de 100% de fibra virgen de *Pinus elliotii* y *Pinus taeda*, empresa Papel Misionero S.A., Argentina). Este papel se humectó durante 12 h (1º reciclo) y se desintegró en un desintegrador estándar. Para facilitar la interpretación de los resultados se trabajó sobre la fracción fibrosa como fue realizado por Lofton y col. (2005), dado que, desde el punto de vista químico, fibras y finos presentan diferencias. Para ello la pulpa obtenida se clasificó en equipo Bauer McNett (Norma SCAN 6:69) del cual se tomó la fracción fibrosa (R100). Luego se llevó a pH 4,0, se centrifugó y finalmente se almacenó a 4 °C.

6.3.3.1. Clasificación cuantitativa de las fibras celulósicas por longitud de fibra

Para clasificar la pulpa según su longitud de fibra se utilizó el equipo Bauer McNett (**Figura 6.3**) y se aplicó la técnica SCAN M6:69. El equipo consiste de cuatro tanques con agitación colocados en forma de cascada, donde circula agua de manera continua. Éstos contienen mallas de distintos tramado. En nuestro caso utilizamos las mallas estándares ASTM 30; 50; 100, colocadas en ese orden.

Se colocaron 10 g de pulpa seca a una consistencia de 5 g/L y se clasificó durante 15 min. Luego se colocaron papeles de filtro en las cazoletas de cada uno de los tanques y se recolectaron las distintas fracciones. Éstas se secaron en estufa a 105 °C y se pesaron utilizando la balanza analítica.



Cazoletas con los papeles de filtro para recolectar las distintas fracciones

Figura 6.3. Clasificador Bauer McNett

6.3.4. Caracterización química de la pulpa

A la fracción fibrosa (R100) de pulpa se le determinó: contenido de extractivos (Norma SCAN-CM 49:03), contenido de lignina insoluble y soluble y además el contenido de cenizas (Norma Tappi T222).

Se le determinó también el contenido de grupos ácidos totales por titulación conductimétrica (Lloyd y col. 1993) y el contenido de grupos ácidos superficiales a través de la técnica de adsorción de polielectrolitos (Wågberg y col.1989).

6.3.4.1. Contenido de extractivos

Se determinó la cantidad de extractivos de la pulpa utilizando como solvente acetona según la Norma SCAN-CM 49:03. Se realizaron 24 extracciones utilizando un extractor *Soxhlet* sobre 3 g de pulpa seca al aire. Luego se evaporó el solvente en un rotavapor bajo vacío a 63 °C, se secó el residuo sólido en estufa a 100-105 °C y se pesó el residuo seco. Se calculó el porcentaje con respecto a la masa original de pulpa seca.

6.3.4.2. Contenido de lignina insoluble, soluble y cenizas

Para la determinación de lignina total se utilizó la pulpa libre de extractivos y se siguió la misma metodología que la detallada para determinar contenido de lignina residual en el xilano (**capítulo 3.2.1.1 c**). Se realizó una hidrólisis ácida (72 % (p/p) H₂SO₄, 1h a 30 °C) a 300 mg de pulpa libre de extractivos. Luego, se diluyó el ácido hasta un 4 % (p/p). Esta solución se colocó en un autoclave a 121 °C por 1 hora. El residuo sólido (lignina insoluble) se filtró con una membrana de fibra de vidrio de 0,45 µm de tamaño de poro de peso conocido y se secó en estufa hasta pesada constante. El filtrado se utilizó para determinar el % lignina soluble.

Además, se realizó el mismo procedimiento a otra muestra de pulpa para determinar cenizas en el residuo sólido, pero se filtró con un filtro de papel y luego se colocó en una mufla a 575 ± 25 °C por 2 horas. El % de lignina insoluble se corrigió por el valor de cenizas obtenido.

Para determinar la lignina soluble se utilizó el filtrado anterior y se midió a 205 nm, utilizando agua deionizada como blanco. Luego considerando la absorptividad de la lignina de 110L g⁻¹ cm⁻¹ se determinó la lignina soluble (Norma Tappi T222).

Para calcular el porcentaje de lignina total libre de extractivos se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Lignina total} = (\% \text{ Lignina insoluble} + \% \text{ lignina soluble}) * (100 - \% \text{ extractivos})/100$$

6.3.4.3. Determinación de los grupos ácidos totales de las fibras por titulación conductimétrica

Se utilizó la misma metodología detallada previamente en el **capítulo 3 (sección 3.2.1.2 a)** para la determinación de los grupos ácidos totales del xilano. Pero en este caso la preparación de la pulpa para la titulación requirió un procedimiento previo.

Inicialmente, se colocó la pulpa dos veces sucesivas en 0,1N HCl durante 45 min, para producir el intercambio de la pulpa a su forma ácida. Luego, se lavó la pulpa con agua deionizada hasta una conductividad en el filtrado menor a 5 µS/cm. En un vaso cerrado se colocaron 3,0 g

de pulpa en 450 mL de 0,001N NaCl, con agitación y atmósfera de nitrógeno y se tituló con 0,1N NaHCO₃. Para cada punto de la titulación se agregó 0,2 mL de titulante y se esperó 5 min hasta alcanzar el equilibrio, se detuvo la agitación y se midió la conductividad de la solución, utilizando un termo/conductímetro marca INOLAB. Se graficó luego la conductividad (μS/cm) en función de los mL de NaHCO₃ agregados.

Luego, el contenido de grupos ácidos totales en la pulpa (meq/g pulpa seca) se determinó utilizando la siguiente ecuación (6.4):

$$\frac{meq}{g_{pulpaseca}} = \frac{V_{NaHCO_3} \cdot N_{NaHCO_3}}{g_{pulpaseca}} \quad (\text{Ec. 6.4})$$

Donde:

V_{NaHCO_3} : Volumen de titulante utilizado para neutralizar los grupos ácidos, en mL.

N_{NaHCO_3} : Normalidad del NaHCO₃, 0,01N.

6.3.4.4. Determinación de grupos ácidos superficiales de las fibras por adsorción polielectrolítica

Para cuantificar el contenido y/o accesibilidad de los grupos ácidos superficiales de las fibras, se utilizó la técnica de la adsorción de un polielectrolito catiónico de alta masa molecular y alta densidad de carga (Wågberg y col.1989). Se agregaron 0,5 g.s. de pulpa húmeda a 100 mL de soluciones de concentraciones crecientes de poli (cloruro de dimetildialilamonio) (pDADMAC), de masa molecular media M_w 400-500 kDa, en un medio con 0,01N de NaCl. Las suspensiones se agitaron por 30 minutos en un baño de agua termostatzado a 25°C. Luego se filtraron y se determinó en el filtrado la concentración del polielectrolito catiónico no adsorbido mediante la titulación polielectrolítica (Terayama 1952).

Se construyó una isoterma de adsorción (adsorción específica, μeq pDADMAC/g pulpa seca, en función de la cantidad de polielectrolito en equilibrio, μeq/ml) y se determinó la cantidad de grupos superficiales de la pulpa por extrapolación a cero de la concentración del pDADMAC en equilibrio.

6.3.5. Determinación de la retención de los PECs sobre fibras celulósicas

Los tratamientos de las fibras celulósicas con los CatPECs y AnPECs se realizaron a una consistencia de pulpa de 0,15% (0,15 g pulpa/100 g suspensión), a pH 6,0 y fuerza iónica de 0,01 N. La concentración de pulpa de 1,5 g/L empleada fue menor a la usual en la industria papeleras, pero se pretendió evitar una retención física de los complejos en la mata fibrosa formada en la filtración y de esta manera cuantificar solo la adsorción del complejo en la fibra.

A las muestras húmedas de 0,5 g de pulpa se añadieron a 330 mL de solución de CatPECs (2,63% CatPECs / g pulpa seca) a pH 6,0 y 0,01 NaCl de fuerza iónica, durante 30 min y bajo agitación utilizando una Jarra BRIT Dinámica para un correcto control de la agitación (600 rpm). Luego, se tomó la suspensión que pasa a través del filtro de metal (75 μ m), sin interrumpir la agitación, y descartando los primeros 15 mL (de acuerdo con Hubbe y col. 2005). El filtrado se utiliza para determinar la cantidad de complejo no adsorbido/retenido en la mata de fibras.

Para el tratamiento con los AnPECs, primeramente, los 0,5 g de pulpa se trataron con 330 mL de solución de Q (0,83%Q/ g pulpa seca) durante 30 minutos. Luego de filtrar la solución de Q no retenida, se adicionó a la pulpa húmeda 330 mL de AnPECs (1,81%) bajo agitación, durante 30 min y se reservó el filtrado. Además, se realizaron tratamientos de referencia con las mismas condiciones mencionadas anteriormente, pero sin adición alguna de aditivos.

La cantidad inicial y la cantidad no retenida de los complejos de los CatPECs y AnPECs se determinó utilizando titulaciones de potencial por flujo de cargas, utilizando polivinil sulfato de potasio (PVSK) y pDADMAC como titulantes.

6.3.6. Formación de las hojas de ensayo

Con el objetivo de formar las hojas de ensayo bajo condiciones controladas de pH y fuerza iónica, en el Instituto de Tecnología Celulósica se cuenta con un sistema de alimentación de agua hacia la formadora compuesto por un tanque de 200 L con recirculación, que contiene agua deionizada. Una bomba dosificadora permite enviar las soluciones concentradas de NaCl y

NaHCO₃ hacia el tanque de manera de acondicionar el agua (pH y conductividad) según los requerimientos de cada tratamiento.

Los tratamientos de la pulpa con los PEC catiónicos se realizaron a una consistencia del 0,15% a pH 6,0 y a una fuerza iónica de 0,01 N NaCl. Además, se realizó un tratamiento referencia (Ref), de la misma manera que los tratamientos con polielectrolitos, excepto que no se agregó ningún aditivo.

Para el tratamiento de la pulpa con los CatPECs inicialmente se prepararon 1,6 L de una solución de Q (0,06 g/L) en 0,01 N NaCl y a pH 6,0 en un recipiente de 5 L, bajo agitación moderada y se le agregó 0,12 L de una solución de Xil utilizando una bomba dosificadora DOSIVAC (**Figura 6.5**) a un caudal de 12 mL/min. Por otro lado, se dispersaron 17 g secos de pulpa en 2 L de agua acondicionada y se colocó en el desintegrador estándar por 1 min, y esta suspensión de pulpa (2 L), más 7,5 L de agua acondicionada se añadieron a las soluciones de complejo catiónico y se dejó bajo agitación durante 30 min.

El tratamiento con los AnPECs se realizó de manera similar, pero la pulpa inicialmente se trató con solución de Q. Para ello, se prepararon 11 L de Q (0,011 mg/L) y se le adicionó 17 g de la pulpa desintegrada (2 L) y se dejó en agitación durante 30 minutos. Luego se filtró en la formadora y se reservó la pulpa tratada. Seguidamente se prepararon 0,37 L de Xil (0,83 g/L) y se le agregó 0,036 L de Q (0,2 mg/L) para formar el AnPECs utilizando una bomba dosificadora y por último se le adicionó la pulpa pretratada con Q junto con 10 L de agua acondicionada y se dejó en agitación durante 30 minutos.

Las hojas de ensayo se formaron de acuerdo a la técnica SCAN-C 26:76. El gramaje de las mismas fue 120 g/m² según las propiedades que se desearon estudiar. Los secantes utilizados en la formación de las hojas se humectaron previamente con la misma agua de trabajo. Las hojas se acondicionaron según técnica SCAN P2:75 (50 ± 2% de humedad relativa y 23 ± 1°C) por un tiempo mayor a 4 horas, previo a la determinación de las propiedades físicas.



Figura 6.4. Formación de los PECs para los tratamientos de la pulpa y formación de las hojas de laboratorio.

Como propiedades tecnológicas para papeles de embalaje se consideraron: densidad aparente (Norma Tappi T220 sp-01), la resistencia a la compresión SCT, resistencia a la tracción en seco (Tappi T 494 om-01), en húmedo (ISO:ISO 3781:1983) y resistencia a la compresión (CMT). Los ensayos se realizaron en ambiente acondicionado en temperatura y humedad (23°C -50% HR).

6.3.7. Evaluación de propiedades papeleras

- Densidad aparente

Para determinar la densidad aparente de las hojas de ensayo, se determinó el espesor de las hojas y el gramaje de las mismas utilizando la Norma Tappi T220 sp-01.

Gramaje (Norma Tappi T410 om-02): se define como el peso de la hoja acondicionada por unidad de área (g/m²).

Espesor (Norma Tappi T411 om-97): se mide el espesor (mm) utilizando un micrómetro automático, el cual aplica a una carga específica sobre la hoja, en un tiempo específico. El valor es afectado por la rugosidad por lo que, para minimizarlo, se determina el espesor de cinco hojas medidas simultáneamente.

Luego se calcula la densidad aparente utilizando la **ecuación 6.5**.

$$\text{Densidad aparente } \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} = \frac{5 \cdot \text{gramaje (g/m}^2\text{)}}{1000 \cdot \text{espesor (mm)}} \quad \text{Ec. (6.5)}$$

- Resistencia a la tracción en seco

La resistencia a la tracción en seco de las hojas de ensayo es un indicativo de la fuerza derivada de factores como: la resistencia de las fibras, la longitud de las fibras y fundamentalmente del grado de unión entre ellas.

Los ensayos se realizaron utilizando la norma Tappi T 494 om-01. Se cortaron probetas de papel de 15 mm de ancho se sujetaron entre dos mordazas separadas 100 mm, en el equipo de ensayo universal (INSTRON 3344). Se estableció una velocidad de elongación constante, para que el ensayo demore entre 15 y 30 min.

- Resistencia a la tracción en húmedo

Se determinó la resistencia a la tracción en húmedo luego de la inmersión del papel en agua destilada a 23 °C por 1 hora, siguiendo la norma ISO 3781:1983. El ensayo se realizó en el equipo universal (INSTRON 3344), igual al procedimiento ya explicado anteriormente.

- Resistencia al aplastamiento de onda (CMT)

Para realizar este ensayo se utilizó la Norma Tappi T 809 om-99. Se determinó la carga máxima de aplastamiento de una probeta de papel formada por 10 ondas de 12,7 mm de ancho. Ésta se fija en una cinta engomada y se somete a un ensayo de compresión.

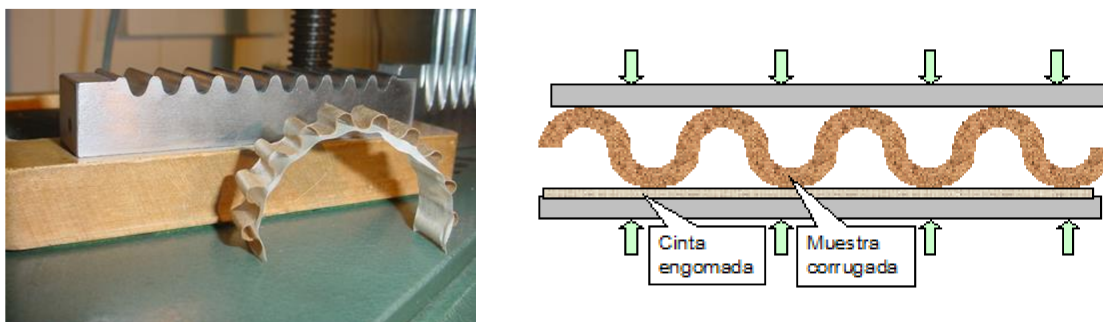


Figura 6.5. Esquema del ensayo CMT.

6.4. RESULTADOS

6.4.1. Caracterización de la adsorción de los CatPECs (30%N) y AnPECs (30% N) sobre una superficie modelo de celulosa nanofibrilar

6.4.1.1. Dinámica de la adsorción de PECs sobre una superficie modelo de CNF utilizando QCM-D

La **Figura 6.6 a)** muestra los cambios en la frecuencia (Δf) y disipación (ΔD) en función del tiempo asignables a la adsorción de los CatPECs sobre la superficie modelo de celulosa nanofibrilar (CNF) cuando se hizo pasar la suspensión durante 30 min. Se puede observar en la gráfica que a los 15 minutos (tiempo cero de paso de la suspensión de CatPECs) se produjo una disminución en la frecuencia de oscilación y un aumento en los valores de disipación. Esto último indica la formación de una capa del tipo viscoelástica.

Eriksson y col. (2005) relacionaron las propiedades viscoelásticas de los polielectrolitos adsorbidos en multicapa (PEM) de PAH y PAA sobre una superficie de óxido de silicio, con los resultados obtenidos del tratamiento de la pulpa con los mismos polímeros sobre las propiedades papeleras de fibras *kraft* de madera blanda blanqueada. Concluyeron que la formación de una multicapa viscosa y con alto contenido de agua (indicada por el ensayo QCM), produce la formación de un papel más resistente. Es de esperar entonces, que la capa tipo viscoelástico obtenida con los CatPECs contribuya a la mejora en propiedades papeleras.

La marcada disminución en los valores de frecuencia, de aproximadamente -36 Hz, indica que hubo una gran cantidad de masa adsorbida. Luego de los 30 minutos de adsorción de los CatPECs, se observó una disminución adicional en la frecuencia y un aumento en la disipación al enjuagar con solución de NaCl (pH 6,0 y 0,01 N). Esto podría deberse a la adsorción de cadenas libres del quitosano las cuales se reacomodan y acceden a la superficie durante el enjuague con NaCl. Ahola y col. (2008) estudiaron por mediciones en QCM-D la adsorción de nano-agregados de celulosa nanofibrilar y de poliamidoaminaepiclorhidrina (PAE) sobre

superficies modelo de celulosa. Los autores también encontraron una disminución en los valores de frecuencia y lo asignaron a la adsorción de algunas cadenas libres de PAE obtenidas a partir de la ruptura de los agregados durante el enjuague.

La **Figura 6.6 b**) muestra los cambios en la frecuencia (Δf) y disipación (ΔD) en función del tiempo cuando los AnPECs preparados a pH 6,0 y a una fuerza iónica de 0,01 N NaCl fueron adsorbidos sobre la superficie modelo de CNF durante 30 min. En este caso los AnPECs tienen carga aniónica y por lo tanto no se pueden adsorber directamente sobre la superficie ya que es también aniónica.

Para ello, luego de obtener una línea de base estable, se inyectó solución de Q (50 ppm) a un caudal de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 30 minutos. En la gráfica se observan cambios en los valores de disipación ($\Delta D > 0$) y de frecuencia, correspondiendo a una adsorción con formación de una capa viscoelástica. Cuando se inyectó la suspensión de PECs, se observa en la gráfica una marcada disminución en los valores de frecuencia y un marcado aumento en los valores de disipación, de manera similar a las curvas del monitoreo de adsorción de los CatPECs. Por lo tanto, ambos PECs forman una capa viscoelástica durante la adsorción sobre la superficie modelo de CNF.

En otros estudios previos realizados por el grupo de trabajo, no se observaron cambios en la disipación (ΔD) cuando se adsorbieron complejos catiónicos de dos polielectrolitos sintéticos PAH/PAA a pH 7,5 sobre una superficie modelo en QCM-D (Galván y col. 2014), indicando la formación de una capa rígida sobre la superficie. Esto puede deberse a que, en este caso, los PECs están formados por dos polielectrolitos lineales que, a pH 7,5 presentan alta densidad de carga, y forman un PEC estequiométrico sin cargas iónicas libres en el interior del mismo. Debido a esto último, no se encuentran hidratados y están adsorbidos en forma plana.

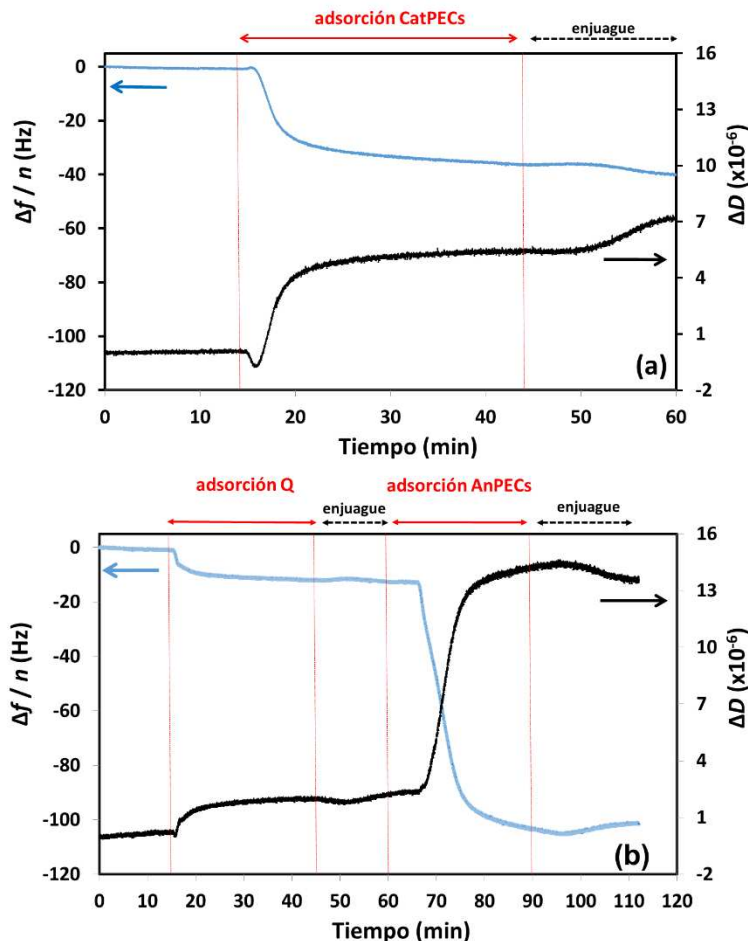


Figura 6.6. Cambios en la frecuencia (Δf) y disipación (ΔD) en función del tiempo para la adsorción **a)** de los CatPECs (30%N) y **b)** del Q seguido de los AnPECs (30% N) en una superficie modelo de CNF preparados a pH 6,0 y NaCl 0,01 N. La frecuencia fundamental utilizada fue f_0 : 5 MHz. Los datos fueron procesados utilizando QTools y se muestra el sobretono n : 3.

6.4.1.2. Dinámica de la adsorción de los PECs sobre una superficie modelo de CNF utilizando SPR

En las **Figuras 6.7 a) y b)** se muestran los sensogramas de SPR obtenidos luego de la adsorción de los CatPECs y de los AnPECs preparados a pH 6,0 y NaCl 0,01 N sobre superficies modelos de CNF, respectivamente. Cuando se adsorbieron AnPECs previamente se adsorbió Q.

Al igual que en los estudios realizados en QCM-D, inicialmente se procedió al enjuague de la superficie modelo con solución de NaCl 0,01 N a pH 6,0, hasta lograr una línea de base estable, para luego proceder a la adsorción del Q o de los PECs, hasta obtener un Δ SPR estable.

De acuerdo a la ecuación 6.3 el cambio en la masa adsorbida en la superficie (Δm_{SPR}) es linealmente proporcional al cambio en el ángulo de ΔSPR . Por lo tanto, se observa que una mayor masa de AnPECs fue adsorbida en comparación con la de CatPECs y con la de Q.

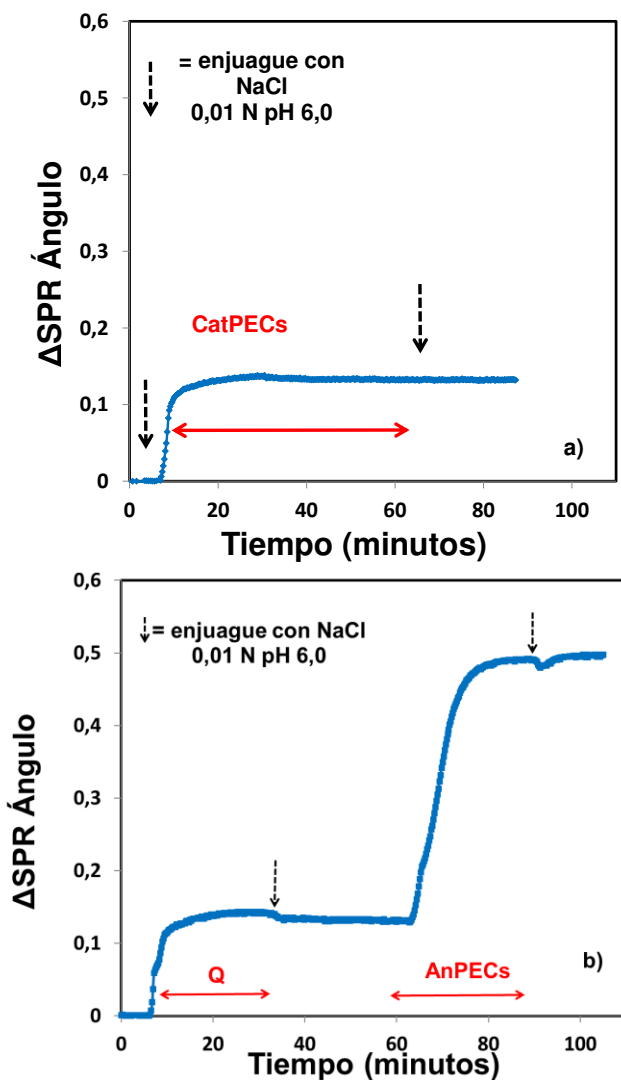


Figura 6.7. Sensograma SPR de la adsorción de los **a)** CatPECs (30%N) (50 ppm) y **b)** AnPECs (30% N) (50 ppm) sobre superficie modelo de CNF, a pH 6,0 y NaCl 0,01 N. Cuando se adsorbió el AnPEC, la superficie fue previamente tratada con solución de Q (50 ppm).

- Determinación de la masa adsorbida de CatPECs sobre la superficie modelo de CNF

Las mediciones obtenidas con el SPR permiten obtener información acerca de la masa seca adsorbida sobre la superficie modelo. En cambio, con las mediciones obtenidas mediante

QCM-D es posible determinar la cantidad de masa total hidratada durante la adsorción de los PECs sobre la superficie modelo.

Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante los análisis en QCM-D y SPR, se calculó la masa seca de PECs adsorbido y el porcentaje de agua presente en la capa de PECs adsorbido en la superficie modelo (**Tabla 6.1**).

$$\Delta m_{\text{QCM-D}}: m_{\text{PECs}} + m_{\text{agua acoplada}}$$

$$\Delta m_{\text{SPR}}: m_{\text{PECs}}$$

La **Tabla 6.1** muestra que la masa adsorbida determinada por QCM-D ($\Delta m_{\text{QCM-D}}$) para ambos PECs resultó ser significativamente mayor a la obtenida a partir de las mediciones SPR (Δm_{SPR}). Esto indica que las estructuras de CatPECs y AnPECs se encuentran muy hidratadas. Particularmente, se obtuvieron mayores valores de contenido de agua para los complejos catiónicos, donde se observa que la capa formada en la adsorción presenta un 96% de agua.

El alto contenido de agua en la capa de PECs adsorbidos indica que los mismos tienen propiedades tipo hidrogel como fue reportado previamente por Orelma (2012). La estructura tipo huevo revuelto de los PECs con algunas cargas inaccesibles podría explicar esta alta capacidad de retención de agua.

Por otro lado, la cantidad adsorbida de agua en la capa de quitosano fue mucho menor que para los PECs. Esto se debe a que el Q es un polielectrolito con una densidad de carga relativamente alta al pH de trabajo. Los polielectrolitos con alta densidad de carga se adsorben de una forma más plana y sin la presencia de agua en su estructura (Tammelin 2006).

Tabla 6.1. Determinación de la masa adsorbida de los PECs y del Q (Δm_{SPR}) y el contenido de agua (Δm_{QCM-D}) acoplada en la capa de adsorción sobre la superficie modelo de CNF, obtenidas a partir de mediciones en QCM-D y en SPR.

	Δm_{QCM-D} (mg/m ²)*	Δm_{SPR} (mg/m ²)*	agua acoplada (%)
CatPECs (30% N)	42,1 ± 0,7	1,6 ± 0,1	96
AnPECs (30% N)	22,7 ± 1,3	4,3 ± 0,1	81
Q	3,5 ± 0,2	1,8 ± 0,7	49

*Se indica el valor medio y el rango de dos réplicas del ensayo (\pm).

6.4.1.3. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La morfología de las superficies obtenidas luego de las adsorciones realizadas de los PECs catiónicos y aniónicos mediante QCM-D, se analizó mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) luego del secado.

Las **Figuras 6.8 a), b), c) y d)** muestran las imágenes de la superficie modelo de celulosa nanofibrilar sola, y las imágenes de la superficie modelo con los CatPECs (30% N), Q y con los AnPECs (30% N) adsorbidos en la superficie modelo de CNF. También se muestran los perfiles de rugosidad obtenidos.

La adsorción de Q sobre la superficie modelo incrementó levemente la rugosidad, lo que indica una capa de adsorción uniforme. En cambio, se puede observar que la adsorción del CatPECs y de los AnPECs sobre la superficie previamente tratada con Q, generó cambios topográficos mayores sobre las superficies modelos de CNF.

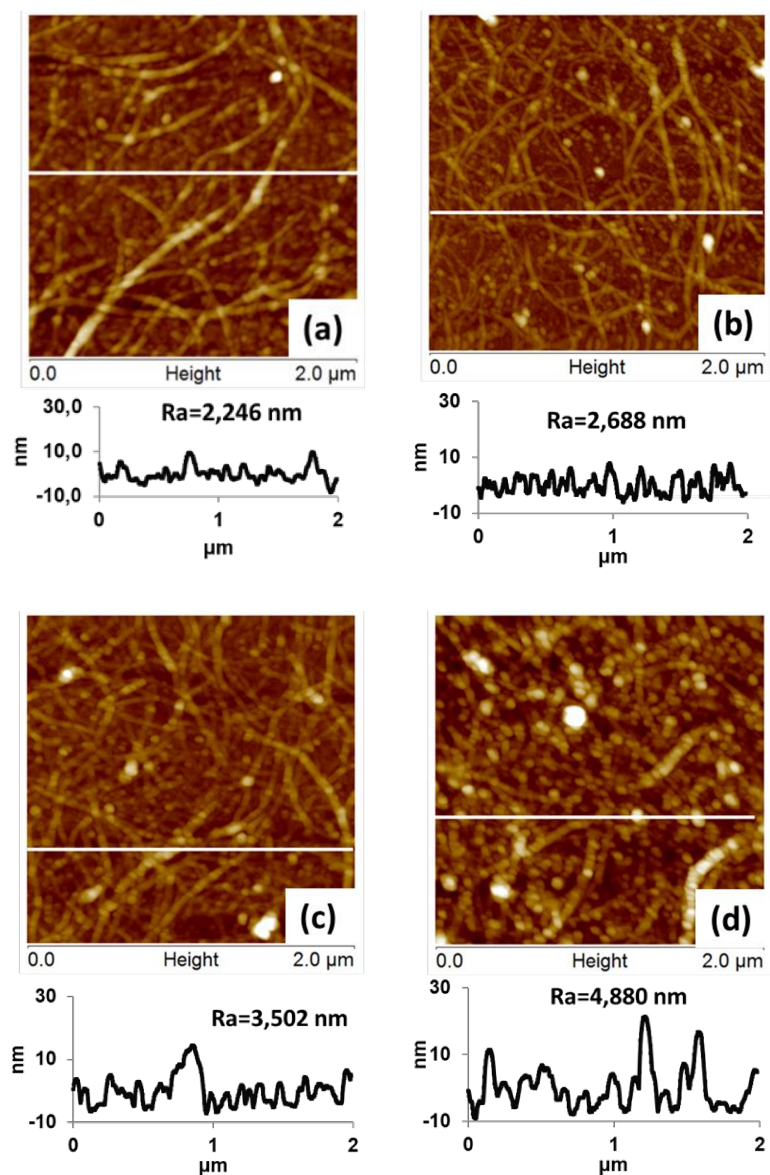


Figura 6.8. Imágenes de AFM topográficas y Ra es la rugosidad media de: (a) superficie modelo de celulosa nanofibrilar y luego de absorber (b) quitosano; (c) CatPECs (30% N); (d) AnPECs (3,0 N). El tamaño de la imagen es de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$.

6.4.2. Caracterización de la pulpa química no blanqueada reciclada

6.4.2.1. Clasificación por longitud de fibra

La **Tabla 6.2** muestra los resultados obtenidos de la clasificación cuantitativa por longitud de fibra utilizando el equipo Bauer McNett (SCAN M6:69 -15 min) y utilizando las mallas estándares ASTM (30, 50, 100 y 200). La fracción utilizada en esta Tesis (R 100), comprende la

fracción fibrosa (R30) y las fracciones medias (30/50 y 50/100), las cuales representan el 84,3% de la pulpa inicial. El 15,7% de la pulpa restante corresponde a la fracción de finos (100/200 y -200).

Tabla 6.2: Clasificación cuantitativa por longitud de fibra.

Mallas	Fracción másica (%)	
R30	73,11	} 84,3% (Fracción R100)
30/50	10,20	
50/100	1,00	
100/200	2,49	
-200	13,21	

6.4.2.2. Determinación de extractivos, cenizas y lignina total en la pulpa

La **Tabla 6.3** muestra los resultados obtenidos de la determinación del contenido de extractivos, cenizas y lignina total. El alto contenido de lignina es característico de pulpas *kraft* no blanqueadas.

Tabla 6.3. Características de la fracción fibrosa R100.

PARÁMETRO	Valor (*)
Extractivos (% sobre pulpa seca)	0,22
Cenizas (% sobre pulpa seca)	0,067
Lignina insoluble (% sobre pulpa seca) ^(a)	11,92 ± 0,10
Lignina soluble (% sobre pulpa seca) ^(a)	0,530 ± 0,002
Lignina total (% sobre pulpa seca) ^(a)	12,4 ± 0,10

(a) Valores referidos a la pulpa original. SD: desviación estándar de tres réplicas del ensayo.
*Se indica el valor medio ± rango de dos réplicas del ensayo.

6.4.3.2. Determinación del contenido de grupos ácidos totales de la pulpa

La **Figura 6.9** muestra una de las curvas de titulación conductimétrica a partir de la cual se determinó el contenido de grupos ácidos totales (GAT).

La pulpa en forma ácida se tituló con NaHCO_3 0,1 N. Se observa en la curva que se gastaron 2,56 mL de NaHCO_3 (punto de intersección entre las líneas de la meseta y la determinada por los mL en exceso adicionados) para neutralizar los grupos ácidos carboxílicos presentes en 2,83 g_{secos} de pulpa.

Aplicando la **ecuación 6.4**, y considerando el promedio de dos réplicas del ensayo, el contenido de grupos ácidos presentes en las pulpas resultó de $90,60 \pm 0,16 \mu\text{eq/g}$ pulpa seca. Lindgren y col. (2002) y informaron valores similares sobre pulpas no blanqueadas.

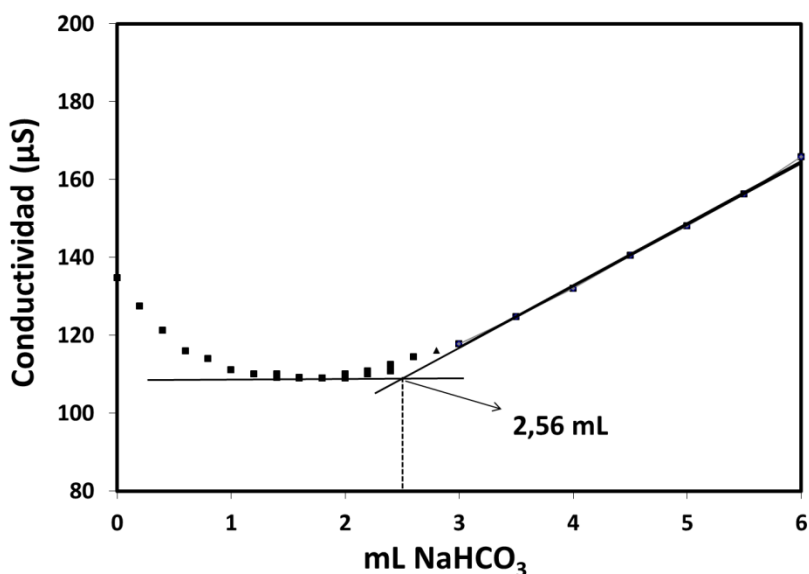


Figura 6.9. Curva de titulación conductimétrica utilizada para determinar los grupos ácidos totales en la pulpa, utilizando NaHCO_3 como titulante, en atmósfera de nitrógeno y bajo agitación continua. Las titulaciones se realizaron por duplicado.

Cálculos realizados utilizando la **ecuación 6.4**:

$$\text{Grupos ácidos totales} = \frac{0,099 \frac{\text{meq NaHCO}_3}{\text{mL}} * 2,57 \text{ mL NaHCO}_3 * 1000}{2,83 \text{ g.s pulpa}} = 90,0 \mu\text{eq/g.s. de pulpa}$$

6.4.3.3. Determinación de los grupos ácidos superficiales de la pulpa

Para cuantificar el contenido y/o accesibilidad de los grupos ácidos superficiales de las fibras, se utilizó la técnica basada en la isoterma de adsorción de un polielectrolito catiónico de alta masa molecular y alta densidad de carga.

La **Figura 6.10** muestra la isoterma de adsorción obtenida, es decir la cantidad de pDADMAC (Mw 400-500 kDa) adsorbido sobre las fibras en función de la concentración del polielectrolito en equilibrio en el medio líquido.

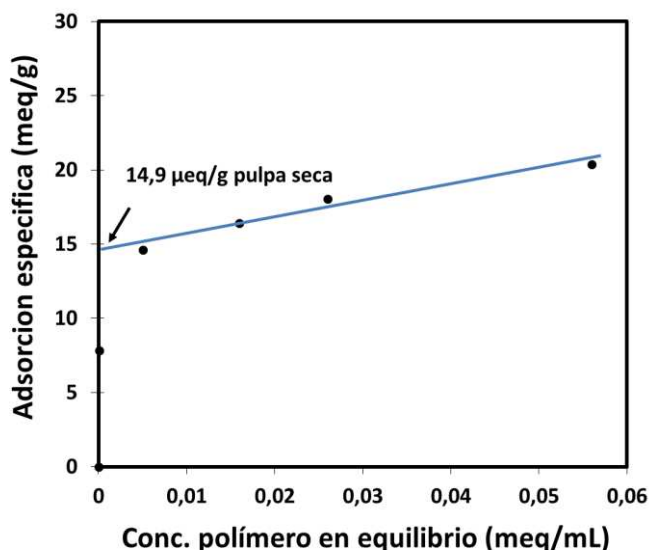


Figura 6.10. Adsorción específica de pDADMAC en función de la concentración del polielectrolito en el medio líquido, determinada por titulación polielectrolítica en 0,01N NaCl. La cantidad de grupos ácidos superficiales de la pulpa se determina luego por extrapolación a cero de la concentración del pDADMAC en equilibrio.

6.4.4. Estudio de la retención de los complejos sobre fibra celulósica

En la **Tabla 6.4** se muestran los dosajes de los CatPECs y AnPECs utilizados sobre pulpa seca para los estudios de retención.

Las cargas superficiales de las fibras celulósicas fueron de 15 $\mu\text{eq/g}$ pulpa seca. Se eligió adicionar a la pulpa la misma cantidad de cargas de complejo catiónico de manera de saturar las cargas superficiales de las fibras celulósicas, dando esto un dosaje del 2,6% g CatPEC/g pulpa.

Para facilitar la adsorción de los AnPECs, la pulpa que posee cargas superficiales aniónicas se trató previamente con solución de Q. En este caso se adicionó un exceso de cargas

positivas de Q (31 $\mu\text{eq/g}$ pulpa) para lograr que se adsorba sobre las fibras celulósicas y que queden fracciones no adsorbidas de las cadenas de Q conteniendo cargas catiónicas libres en solución para que luego se adsorban los complejos aniónicos. El dosaje total correspondiente al pretratamiento con el Q y al tratamiento posterior con los AnPECs, es el mismo que el dosaje total utilizado para el tratamiento con el complejo catiónico.

Además, estos dosajes se corresponden con los utilizados en la industria papeleras (2% en pulpa seca) de almidón catiónico como agente de resistencia.

Tabla 6.4. Dosajes de xilano y quitosano agregados a la pulpa para los estudios de retención y para la formación de las hojas de ensayo.

PEC	Tratamiento previo (Q)	Tratamiento con los PEC			Dosaje final (% en pulpa seca)
	(% en pulpa seca)	Xil (% en pulpa seca)	Q (% en pulpa seca)	$\mu\text{eq PEC}$ adicionado/ g pulpa seca	
CatPEC (30%N)		1,8	0,83	15 $\mu\text{eq/g}$ pulpa	2,6
AnPEC (30%N)	0,82 (31 $\mu\text{eq/g}$ pulpa seca)	1,8	0,01	10 $\mu\text{eq/g}$ pulpa	2,6

Los estudios de retención de los CatPECs (30% N) y AnPECs (30% N) sobre las fibras celulósicas *kraft* no blanqueadas se realizaron utilizando una Jarra Dinámica con agitación controlada.

La cantidad de PECs retenidos en la pulpa se determinó teniendo en cuenta la cantidad inicial añadida y la cantidad de PEC no retenida mediante medidas de potencial por flujo de cargas. Una alícuota del filtrado (70 mL) se tituló empleando una solución de PVSK (200 μN) como titulante. A continuación, se muestran los cálculos realizados para una de las mediciones:

- **Cantidad de PEC presente en el filtrado según titulación con PVSK:**

$$\frac{V_{PVSK} \cdot N_{PVSK} \cdot V_{TOTALscion}}{V_{TITULADO} \cdot 1000 \cdot 0,55 \frac{meqPEC}{g}} = 8,86 \text{ mg}$$

Donde: V_{PVSK} : 5,25 mL; N_{PVSK} : 200 μN ; $V_{TOTALscion}$: 330 mL; $V_{TITULADO}$: 70,0 mL

- **Cantidad PEC adsorbida (mg)**

$$\text{mgPEC}_{\text{INICIAL}} - \text{mgPEC}_{\text{EXCESO}} = 13,8 \text{ mg} - 8,86 \text{ mg} = 4,94 \text{ mg}$$

- **Adsorción Específica de PECs (mg PEC/g pulpa)**

$$\frac{\text{Cantidad PEC adsorbida (mg)}}{\text{Peso seco de pulpa (g)}} = 9,89 \text{ mg/g pulpa seca}$$

$$\% \text{ RETENCIÓN} = \frac{\text{PEC retenido (mg)}}{\text{PEC agregado (mg)}} * 100 = 35,7 \%$$

Para la determinación de cantidad de AnPECs retenido en la pulpa, se evaluó la concentración de este en el filtrado utilizando como titulante una solución estandarizada de pDADMAC (460 μN) y se realizaron los mismos cálculos.

En la **Tabla 6.5** se muestran los resultados obtenidos de los PECs adsorbidos (% sobre la pulpa), luego de interaccionar durante 30 minutos bajo agitación continua con las fibras celulósicas. Para los complejos catiónicos, los resultados mostraron una baja retención (36,7 %). Esto podría deberse a que los complejos catiónicos forman una capa más hidratada, saturando la superficie de las fibras e impidiendo la adsorción de mayores cantidades. No obstante, esta cantidad adsorbida puede ser útil para mejorar las propiedades papeleras.

Por otro lado, se observa que la cantidad de AnPECs retenido en las fibras fue mucho mayor que la cantidad retenida de CatPECs. Estos resultados coinciden con los valores obtenidos en la adsorción de los PECs sobre una superficie modelo de CNF utilizando las técnicas de SPR y QCM-D, donde se observa que la cantidad de masa seca adsorbida de AnPECs fue mayor que la de CatPECs, y que los complejos catiónicos forman una capa con mayor contenido de agua durante la adsorción.

Tabla 6.5. Retención sobre pulpa de los CatPECs y de los AnPECs determinada utilizando titulación polielectrolítica sobre el filtrado de la jarra dinámica.

PEC	PEC retenido (% sobre pulpa seca)*
CatPEC (30% N)	36,7 ± 1,2
AnPEC (30% N)	60,0 ± 0,81

*Se indica el valor medio ± rango de dos réplicas del ensayo.

6.4.5. Formación de las hojas de ensayo y evaluación de las propiedades papeleras

Los dosajes utilizados para la formación de las hojas (2,6 % sobre pulpa) fueron los mismos indicados previamente en la **Tabla 6.4.** para los estudios de retención de los PECs sobre las fibras.

Las hojas de ensayos de referencia (pulpa sin aditivos) y las hojas de ensayos obtenidas a partir de pulpas tratadas con los CatPECs (30% N), Q y AnPECs (30% N) (previamente tratada con Q) a pH 6,0 y NaCl se formaron a una concentración de pulpa de 0,15 g/L.

Los resultados obtenidos se muestran en las **Figuras 6.11 a), b), c) y d).** En comparación con la pulpa de referencia, todas las propiedades de resistencia se incrementaron cuando la pulpa fue tratada con los PECs, principalmente cuando fue tratada con los PECs catiónicos. Particularmente, la adición de CatPECs y AnPECs en pulpa aumentó 53% y un 48% la resistencia a la tracción en seco y un 74% y 49% la resistencia a la compresión, respectivamente. El mayor aumento en las propiedades con la adición de los CatPECs podría deberse al mayor contenido de agua en su estructura.

Los resultados de resistencia a la tracción en húmedo muestran que esta propiedad mejora con la adición de Q o con la adición de CatPECs. Sin embargo, en comparación con la pulpa tratada con Q, los AnPECs disminuyen la resistencia en húmedo, probablemente debido a la presencia de cargas libres del Xil que hacen a la hoja más hidrofílica.

Por otro lado, no se observaron cambios significativos en la densidad aparente para ninguno de los tratamientos realizados.

Varios autores han mostrado incrementos en la resistencia en húmedo y en seco del papel utilizando PECs preformados y han atribuido estas mejoras al aumento de la adherencia entre las fibras (Ankerfors y Wågberg 2014).

Ankerfors y col. (2009) mostraron que los complejos de PAH / PAA forman una serie aleatoria de puntos de contactos en la interfaz sólido-líquido que puede crear uniones eficientes entre dos superficies tratadas y de esta forma aumentar la adherencia entre las fibras. Probablemente este tipo de fenómenos ocurren con los complejos de polielectrolitos naturales de xilano y quitosano estudiados en este trabajo.

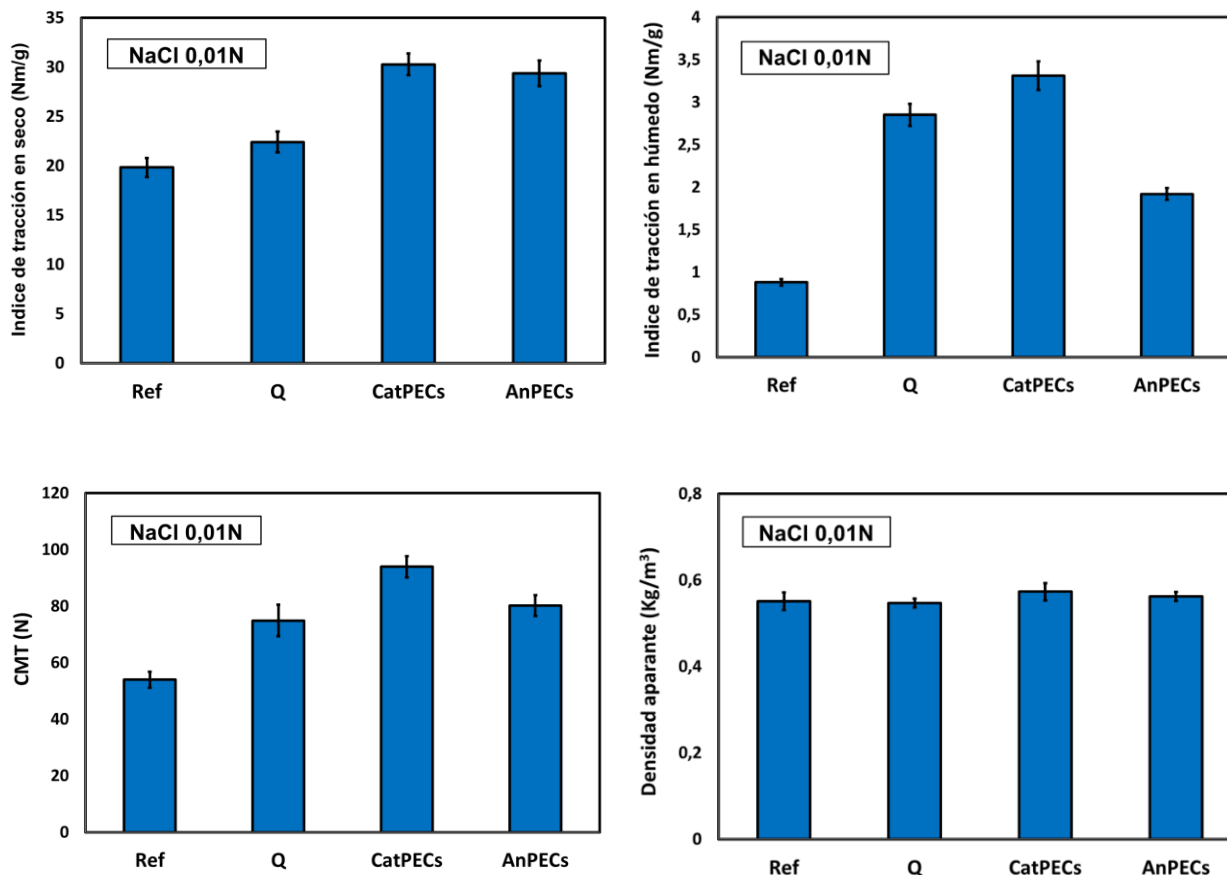


Figura 6.11. Propiedades físicas de las hojas de ensayos en función de los distintos tratamientos realizados a pH 6,0 y 0,01 N NaCl. Ref: Hoja de referencia sin aditivos; Q: 0,83% de quitosano sobre pulpa; CatPECs: 0,83% Q + 1,8 % Xil sobre pulpa; AnPECs: 1,8% Xil + 0,01% Q sobre pulpa previamente tratada con 0,82% de Q. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de la media de 10 réplicas del ensayo.

6.5. CONCLUSIONES PARCIALES

Los complejos catiónicos CatPECs (30% N) y los complejos aniónicos AnPECs (30%N) preparados a pH 6,0 y fuerza iónica 0,01 N NaCl mostraron capacidad para adsorberse sobre una superficie modelo de celulosa nanofibrilar. Las capas de CatPECs y AnPECs adsorbidos sobre estas superficies mostraron comportamientos viscoelásticos. Estas capas están altamente hidratadas, mostrando propiedades tipo hidrogel. Los complejos preparados mediante la adición de Xil sobre Q son los que mostraron formar una película con mayor contenido de agua (98%).

La cantidad de CatPECs retenida en las fibras celulósicas fue marcadamente menor a la cantidad de AnPECs retenidos en las fibras previamente tratadas con Q. Estos resultados coinciden con los valores obtenidos en la adsorción de los PECs sobre una superficie modelo de celulosa nanofibrilar (CNF) indicando que tanto QCM-D y SPR son técnicas útiles para predecir el comportamiento que pueden tener los complejos de polielectrolitos sobre las fibras celulósicas.

La capa hidratada de CatPECs adsorbida sobre las fibras celulósicas cuando se agregó un 2,6% sobre pulpa seca, logró mejorar significativamente la resistencia a la compresión CMT, así como la resistencia en seco y en húmedo del papel obtenido. Esto indica que este aditivo puede ser potencialmente utilizado como agentes de resistencia de papeles reciclados.

Los AnPECs adsorbidos sobre las fibras previamente tratadas con Q, a pesar de que se adsorbieron en mayor cantidad, no lograron alcanzar las mejoras obtenidas con los CatPECs.



CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES
FINALES



7. CONCLUSIONES FINALES

Los resultados de esta Tesis muestran que es posible utilizar con éxito al xilano extraído de madera de una latifoliada en nuevas aplicaciones como: a) películas para embalaje, b) hidrogeles para liberación controlada de drogas y c) para la mejora de resistencia de papeles marrones reciclados. De esta manera se logra ampliar las posibilidades de uso de este polisacárido que, hasta el día de hoy, no es aprovechado de manera eficiente. Para lograrlo, se recurrió a la formación controlada de complejos de polielectrolitos por combinación de este xilano con otro polímero natural, el quitosano.

Se ha mostrado en esta Tesis que las características de los complejos formados como: el tamaño, densidad de carga, potencial zeta, turbidez de la suspensión coloidal y estabilidad, dependen de las condiciones del medio líquido (fuerza iónica y pH), el orden de agregado y concentración de los polielectrolitos.

La formación de complejos de xilano de bajo peso molecular (20 kDa) y quitosano de alto peso molecular (180 kDa) a pH moderadamente ácido presentan desviaciones a la estequiometría 1:1. Estas desviaciones son aún mayores cuando la fuerza iónica del medio aumenta y cuando se adiciona el polielectrolito de mayor peso molecular (Q) al de menor peso molecular (Xil). Estas desviaciones se deben principalmente a la conformación que adquieren los complejos y que hace que cierta cantidad de cargas iónicas queden inaccesibles para los efectos coloidales y para el agregado de cantidades adicionales de polielectrolitos. Esto afecta la estabilidad del complejo y su comportamiento dinámico en el ensayo de potencial por flujo de cargas (PFC) o potencial zeta. Por lo tanto, solo el uso de condiciones idénticas en la formación de los complejos puede conducir a resultados repetitivos.

La caracterización de los complejos de Xil/Q permitió relacionar dichas características con las propiedades de las películas e hidrogeles obtenidos a partir de los mismos, como así también en su uso como aditivo papelerero.

Para la obtención de películas e hidrogeles se propuso formar complejos de polielectrolitos catiónicos estables por adición controlada de una solución de xilano sobre una de quitosano que se encontraba en exceso. Para lograrlo, la cantidad adicionada de xilano debe limitarse preservando las características de complejo de polielectrolito catiónico.

Las propiedades de las películas formadas conteniendo un 70 Xil/30 Q (%p/p) y bajas cantidades de plastificante (10 % p/p de glicerol) presentan cierto potencial para reemplazar a los polímeros sintéticos comerciales. Estas películas son uniformes, son excelentes como barrera al oxígeno y exhiben propiedades mecánicas aceptables. Sin embargo, resultaron ser hidrofílicas, lo cual limita su campo de aplicación. No obstante, esta propiedad puede ser mejorada, por ejemplo, modificando químicamente al xilano o por adición de componentes hidrofóbicos.

Para su uso en el envasado de alimentos, las películas presentan una favorable actividad antimicrobiana frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Esta propiedad permitiría evitar el agregado de conservantes, mejorando la seguridad y la vida útil de los alimentos.

Las películas basadas en 70% p/p de xilano obtenidas a pH 5,0 por agregado gradual de la solución de xilano sobre la de quitosano dan lugar a hidrogeles con buenas propiedades mecánicas. Estos hidrogeles soportan la inmersión en medio ácido (pH 2,0). Si la película es tratada con un agente de entrecruzamiento, el material muestra un desempeño apto como hidrogeles para la liberación de principios activos aniónicos via oral. El uso de citrato/ácido cítrico como agente entrecruzante no es tóxico, permite preservar la biocompatibilidad y evita la necesidad de una etapa de purificación que se requiere cuando entrecruzantes químicos son usados en la preparación del hidrogel. El tratamiento con citrato/ácido cítrico es esencial para alcanzar una capacidad aceptable de carga del principio activo desde la solución de la droga considerada. Esto es posible, por la acción del citrato de sodio como intermediario en un proceso de intercambio iónico que permite la interacción de la droga aniónica con el hidrogel que presenta grupos catiónicos libres. El proceso verificado resulta novedoso, ya que el mecanismo general de

intercambio iónico no es ponderado en la bibliografía general relativa a la adsorción y liberación controlada de drogas. Esta interacción permitió una liberación más controlada aun después de que el hidrogel cargado fue sometido a una etapa ácida que simula el paso por el estómago en una administración oral de la droga considerada.

Para el análisis de interacción de los complejos Xil y Q con superficies modelo o con fibras celulósicas, se consideró el uso de complejos catiónicos y aniónicos. Se consideró aquí un pH 6,0 más compatible con las condiciones usuales en la fabricación de papel. Los complejos aniónicos se obtuvieron por agregado gradual de solución de quitosano sobre solución de xilano limitando este agregado a una reducción solo parcial de la carga coloidal aniónica inicial. Para analizar la adsorción de los polímeros aniónicos, la superficie modelo fue tratada con solución de quitosano. El monitoreo de la adsorción de los complejos sobre una superficie modelo lignocelulósica demostró que ambos complejos estudiados (catiónicos y aniónicos) se adsorben en forma irreversible y forman una capa viscoelástica altamente hidratada.

La adición de un dosaje de PECs similar al utilizado en la industria papelera, sobre pulpa kraft no blanqueada de recicló permitió aumentar significativamente la resistencia a la tracción y a la compresión. Esto indica que los PECs son efectivos como agentes de resistencia para papeles no blanqueados destinados a embalaje.

Teniendo en cuenta todos los resultados, se puede esperar que la producción de películas a partir del xilano permita contribuir a la posibilidad de desplazar a algunos de los materiales de embalaje actuales por un material conveniente por su baja huella de carbono y alta biodegradabilidad. Por su parte, los hidrogeles implican una aplicación del xilano en productos de alto valor. Las propiedades particulares indicadas en la Tesis pueden hacer que éstos sean competitivos. Por su parte, la aplicación como aditivo en la producción de papel implica un potencial uso masivo de un material que puede obtenerse en la misma industria lignocelulósica y puede reemplazar almidones modificados o aditivos sintéticos usualmente usados en papel.



ANEXOS



ANEXO 1:

A.1. Determinación de la pureza del xilano

A.1.1. Determinación del contenido de xilosa mediante cromatografía iónica (HPAEC-PAD)

- Curva de calibrado D-xilosa

Para la curva de calibrado se prepararon soluciones estándares de aproximadamente 2000 ppm de D-xilosa (Sigma Aldrich "ultra" > 99% de pureza) y de L-fucosa (Sigma Aldrich), siendo este último el patrón interno. Además, se determinó la humedad de los estándares por pesada antes y después de secado en una estufa con vacío (60°C, 60 mmHH) y este valor fue utilizado para obtener la concentración exacta de las soluciones preparadas.

Se realizaron cinco disoluciones de la solución D-Xilosa de 2000 ppm, de manera de obtener las siguientes concentraciones: 2,5; 6; 12; 20 y 30 ppm. A cada uno de los patrones se le adicionó la misma cantidad de patrón interno (fucosa), aproximadamente 0,48 mL (20 ppm) de la solución de 2000 ppm. Los patrones se prepararon y se inyectaron por duplicado.

En la **Figura A1.1** se muestra un cromatograma típico de un patrón de D-Xilosa conteniendo L-fucosa como patrón interno analizado por HPAEC-PAD. Se observa que el tiempo de retención de L-fucosa fue de 4,65 min y el de D-xilosa fue de 12,04 min.

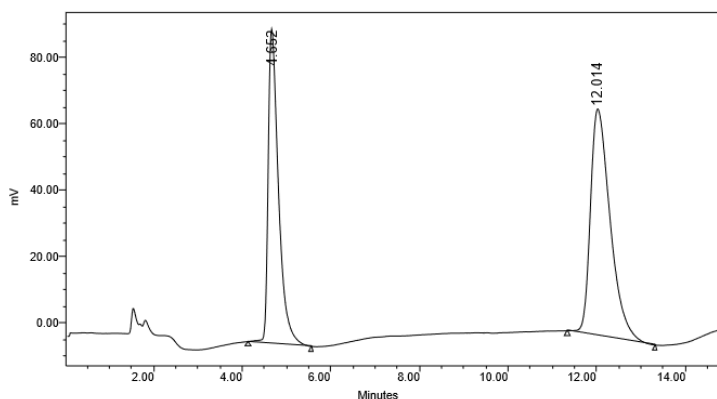


Figura A1.1. Cromatograma del patrón L-fucosa (en 4,6 min) y del patrón interno D-Xilosa (en 12,0 min). Las condiciones de operación del equipo fueron: 16mM NaOH a un flujo de 1,0 ml/min y temperatura de columna 40°C.

En la **Tabla A1.1** se muestran los valores de relaciones de áreas $A_{\text{fucosa}}/A_{\text{xilosa}}$ obtenidos de las diferentes diluciones de la sustancia patrón D-Xilosa analizados por duplicado y en la **Figura A1.2** se muestra la curva de calibrado de obtenida. Se observa buen ajuste (R^2 0,999) de la curva y una respuesta lineal del analito en el rango de las concentraciones de trabajo seleccionadas. Esta curva fue utilizada para determinar la concentración de xilosa en las muestras analizadas.

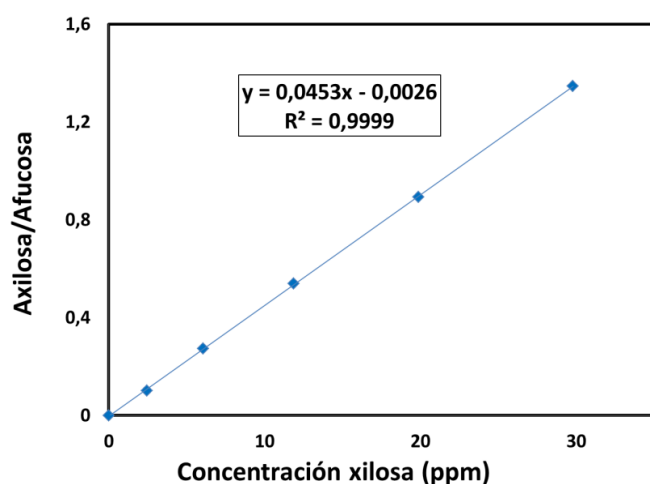


Figura A1.2. Curva de calibrado de D-Xilosa obtenida utilizando cinco puntos y L-Fucosa como patrón interno.

Tabla A1.1. Valores de relación de A_x/A_f obtenidos utilizando cinco diluciones de la sustancia patrón D-Xilosa y utilizando L-Fucosa como patrón interno

Concentración de xilosa inyectada (ppm)	Relación A_x/A_f	Promedio relación A_x/A_f
0	0	0
2,46	0,102	0,102
	0,102	
6,05	0,278	0,274
	0,269	
11,9	0,522	0,540
	0,559	
19,9	0,879	0,893
	0,907	
29,8	1,33	1,35
	1,36	

- Estándar de recuperación de azúcar (SRS)

En la **Figura A1.3** se puede observar un cromatograma obtenido para una muestra de D-Xilosa sometida al proceso de hidrólisis ácida, (análisis de estándar de recuperación de azúcar (SRS)).

Para determinar el % de pérdida debida a la destrucción de azúcares durante la hidrólisis ácida, se utilizó la curva de calibrado y la relación de área entre L-Fucosa y D-Xilosa para determinar la concentración de xilosa presente en los 40 μL inyectados del estándar de

recuperación de azúcar (31,16 ppm). El valor obtenido se comparó con la concentración de xilosa conocida en la muestra tratada (31,51) y se obtuvo una diferencia del 1,1%.

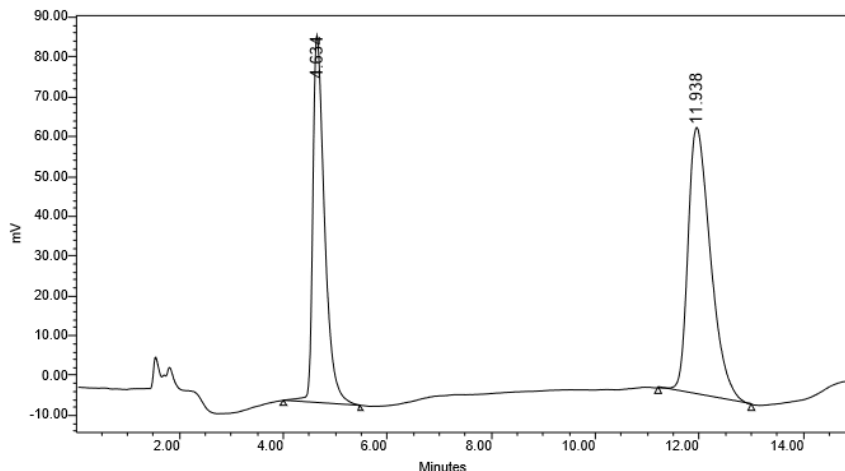


Figura A1.3. Cromatograma para una muestra de D-Xilosa sometida al proceso de hidrólisis ácida. Las condiciones de operación del equipo fueron: 16mM NaOH a un flujo de 1,0 ml/min y temperatura de columna 40°C.

- Determinación del contenido de xilosa en el xilano comercial

La **Figura A1.4** muestra un cromatograma típico correspondiente a la muestra del xilano comercial hidrolizado en medio ácido. Se observa que el tiempo de retención de la fucosa (patrón interno) fue de 4,6 min y el de xilosa de 11,9 min.

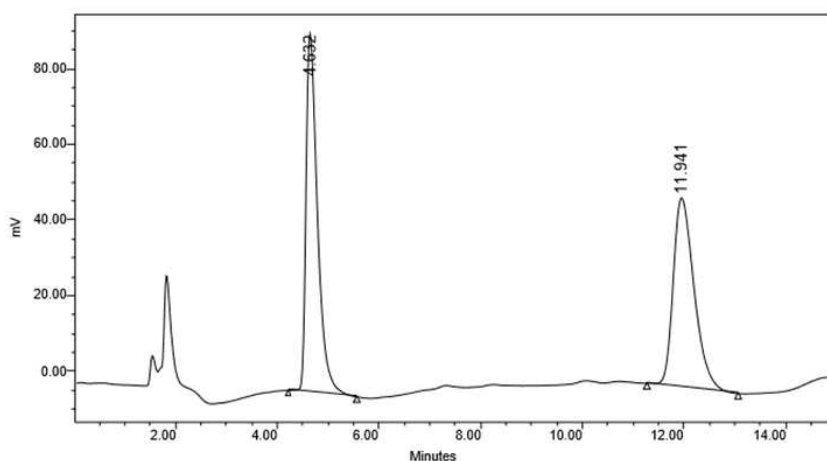


Figura A1.4. Cromatograma obtenido del hidrolizado en medio ácido del xilano de madera de haya Sigma-Aldrich (beechwood, latifoliada). El pico a 4,6 min corresponde a la fucosa y el pico a 11,9 min a la xilosa. Eluyente: 16mM NaOH a un caudal de 1,0 ml/min y temperatura de columna 40°C.

Para determinar el contenido de xilosa presente en el xilano comercial se analizaron los cromatogramas obtenidos y las relaciones de áreas $A_{\text{fucosa}}/A_{\text{xilosa}}$. Teniendo en cuenta la curva de calibrado y corrigiendo el valor por las pérdidas debidas a la degradación de los azúcares bajo las condiciones de la hidrólisis ácida (1,1% de pérdidas), los resultados finales para dos réplicas fueron: 26,08 mg xilosa/L y de 24,71 mg xilosa/L.

Finalmente, teniendo en cuenta la concentración inicial de xilano utilizado para el ensayo y que la xilosa pierde una molécula de agua cuando forma parte del polímero xilano, se determinó la relación: masa de xilosa (en el polímero) / masa de xilano_{seco}.

A continuación, se muestran los cálculos realizados utilizando los valores obtenidos de a partir de uno de los cromatogramas:

$$\text{masa de xilosa}_{(\text{en el polímero})} / \text{masa de xilano}_{\text{seco}} = \frac{26,08_{\text{ppm xilosa}}}{28,85_{\text{ppm Xil}}} * \frac{132_{\text{g/mol}}}{150_{\text{g/mol}}} = 0,795$$

Donde:

- concentración de Xil inicial: 28,85 ppm
- concentración de xilosa detectado= 26,08 ppm
- peso molecular xilosa (en el polímero) = 132 g/mol
- peso molecular xilosa= 150 g/mol

El valor obtenido del resultado de dos réplicas fue de **0,786 ± 0,010 g xilosa**_(en el polímero) / g xilano_{seco}

A.1.2. Determinación del contenido de grupos ácido 4-O-metilglucurónicos por método de Scott.

- Curva de calibrado del ácido D-galacturónico utilizando el método de Scott

Como estándar para realizar la curva de calibrado, se utilizó el ácido D-galacturónico suministrado por Sigma Aldrich. Este compuesto presenta la misma absorptividad molar que el ácido 4-O- metilglucurónico.

Para obtener la curva de calibrado se preparó una solución madre del ácido D-galacturónico a una concentración de 792 ppm y se realizaron cuatro diluciones (76; 58; 38 y 19 ppm).

En la **Tabla A1.2** se muestran los valores obtenidos de la diferencia de absorbancia entre 450 y 400 nm para las diferentes diluciones. En la **Figura A1.5** se puede observar la curva de calibrado de la sal de sodio del ácido D-galacturónico obtenida con cuatro diluciones de la solución patrón. Se observa una respuesta lineal del analito en el rango de las concentraciones de trabajo seleccionadas y que la curva obtenida presentó un buen ajuste (R^2 0,9976). Esta curva fue utilizada para determinar la concentración de grupos ácidos glucurónicos en el xilano de madera de haya.

Tabla A1.2. Valores de absorbancia obtenidos para la curva de calibrado.

Conc. Ac. Galacturónico (ppm)	Absorbancia (450 nm-400 nm)	Absorbancia Promedio
0	0,001 0,012 0,004	0,004
19,1	0,124 0,125 0,113 0,113	0,119
38,3	0,229 0,229 0,243 0,243	0,236
58,2	0,386 0,384 0,352 0,356	0,369
76,6	0,455 0,459 0,457	0,457

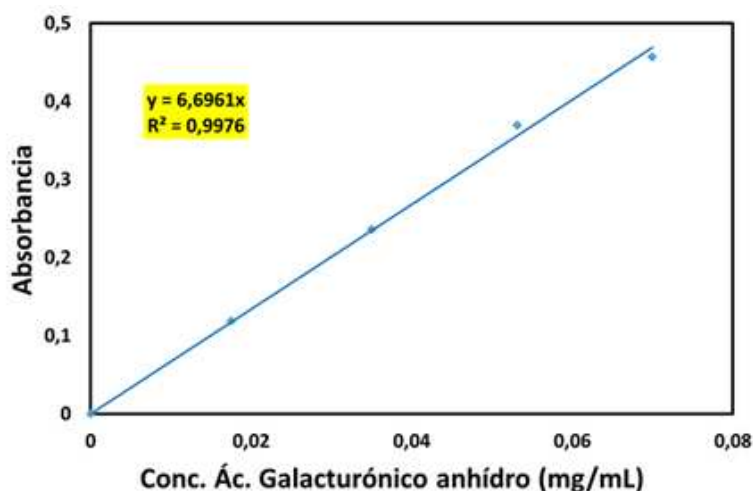


Figura A1.5. Curva de calibrado del ácido D-galacturónico anhidro obtenida mediante el método de Scott.

El ácido D- galacturónico posee la misma absorptividad molar que el ácido 4-O-metilglucurónico. Pero cuando estos grupos ácidos son constituyentes de polímeros es necesario multiplicar la absorptividad del anhidrido urónico del estándar por un factor de 1,12. Es decir, en este caso la absorptividad utilizada fue de: $6,69 \cdot 1,12 = 7,49$.

- Contenido de grupos ácido 4-O-metilglucurónicos en el xilano comercial

Las muestras se prepararon siguiendo la metodología indicada en el capítulo 3 sección 3.2.1.1 a). A continuación, en la tabla se muestran los resultados obtenidos:

Muestra	Absorbancia (450 -400) nm	Ácido glucurónico en el polímero (mg/mL)	mg ácido glucurónico en el polímero /g xilano seco
X1	0,381	0,050	108,9
X2	0,394	0,052	112,6

El valor promedio obtenido fue: **0,110 ± 0,002 g ácido 4-O-metilglucurónico(en el polímero)/ g xilano**

seco•

A.1.3. Cálculos para determinar la pureza del xilano

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de contenido de xilosa y contenido de ácidos glucurónico en el xilano comercial, se determinó la pureza a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Pureza} = \left(0,787 \frac{\text{g xilosa anhidrida}}{\text{g xilano seco}} + 0,110 \frac{\text{g ác. glucurónico anhidrido}}{\text{g xilano seco}} \right) * 100 = 89,7\% \text{ Xil}_{\text{seco}}$$

Por otro lado, también se puede determinar la relación ácidos glucurónicos: xilosa presente en el xilano.

$$\text{moles xilosa / moles ácido glucurónico} = \frac{5,96 \text{ mmoles xilosa}}{0,574 \text{ mmoles ác. glucurónico}} = 10,4$$

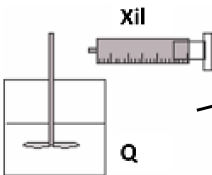
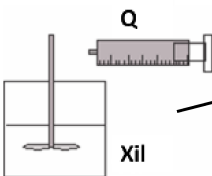
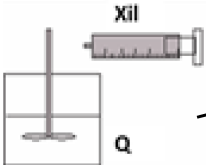
Donde:

$$\text{-moles de xilosa} = \frac{0,787 \text{ g xilosa anhidrida}}{132 \text{ g/mol}} = 5,96 \text{ mmoles de xilosa}$$

$$\text{-moles de ácido glucurónico} = \frac{0,109 \text{ g ác. glucur. an h.}}{190 \text{ g/mol}} = 0,574 \text{ mmoles de ác. glucurónico}$$

Es decir, que el xilano de madera de haya utilizado en este trabajo presenta, en promedio, un grupo ácido 4-O-metilglucurónico cada 10-11 moléculas de xilosa.

ANEXO 2:**A2.1. Condiciones de caracterización y formación de los complejos de polielectrolitos**

	pH	Fuerza iónica (N NaCl)	Conc. Xil	Conc. Q	Capítulo	
Efecto del orden de agregado						
	Monitoreo formación Xil--Q	6,0	0,1 0,01	2,5 g/L	0,06 g/L	3
	Monitoreo formación Q--Xil	6,0	0,1 0,01	0,83 g/L	0,2 g/L	3
Preparación complejos 30 %N						
	CatPECs (30% N)	6,0	0,1 0,01	2,5 g/L	0,06 g/L	3
	AnPECs (30% N)	6,0	0,1 0,01	0,83 g/L	0,2 g/L	3
Preparación complejos para obtención de películas e hidrogeles						
	Monitoreo formación Xil--Q	5,0	0,03	4,0 g/L	2,5 g/L	4

CatPECs para obtención de películas	5,0	0,03	4,0 g/L	2,5 g/L	4 y 5
Complejos para la adsorción sobre superficie modelo y sobre en fibras celulósicas					
CatPECs adsorción sobre superficie modelo	6,0	0,01	2,5 g/L	0,06 g/L	6
AnPECs adsorción sobre superficie modelo	6,0	0,01	0,83 g/L	0,2 g/L	6
CatPECs estudios de retención	6,0	0,01	2,5 g/L	0,06 g/L	6
AnPECs estudios de retención	6,0	0,01	0,83 g/L	0,2 g/L	6
CatPECs formación de hojas de ensayo	6,0	0,01	2,5 g/L	0,06 g/L	6
AnPECs Formación de hojas de ensayo	6,0	0,01	0,83 g/L	0,2 g/L	6

CONTRIBUCIONES

Este trabajo de Tesis dio lugar a las siguientes publicaciones y congresos:

PUBLICACIONES:

- **"Polyelectrolyte complexes for assisting the application of lignocellulosic micro/nanofibers in papermaking"** C. N. Schnell, Quim Tarrés, María V. Galván, Paulina Mocchiutti, Marc Delgado-Aguilar, Miguel A. Zanuttini, Pere Mutjé. *Cellulose Journal*. (Accepted with review).
- **"Films from xylan/chitosan complexes: Preparation and characterization"**. C. N. Schnell, M. V. Galván, M. S. Peresin, M. C. Inalbon, J. Vartiainen, M. A. Zanuttini, Paulina Mocchiutti. (2017) *Cellulose Journal*. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1411>.
- **Cationic and Anionic Polyelectrolyte Complexes of Xylan and Chitosan. Interaction with lignocellulosic surfaces.** Paulina Mocchiutti, Carla N. Schnell, Gerardo D. Rossi, María S. Peresin, Miguel A. Zanuttini, María V. Galván. *Carbohydrate Polymers*. Publicado Octubre (2016) (Volumen 150, Páginas 89-98).

CONGRESOS:

- **XVI Simposio Latinoamericano de Polimeros SLAP 2018** "Environment-Sensitive Hydrogel as Drug Delivery System" Carla N. Schnell, María Veronica Galván, Miguel A. Zanuttini y Paulina Mocchiutti. Aceptado para presentación a realizarse del 6 al 9 de Noviembre en Mar del Plata, Argentina.
- **XVI Simposio Latinoamericano de Polimeros SLAP 2018** "Hydrogels from Natural Polyelectrolyte Complexes for Drug Controlled Released" María Veronica Galván, Carla N. Schnell, Miguel A. Zanuttini y Paulina Mocchiutti. Aceptado para presentación a realizarse del 6 al 9 de Noviembre en Mar del Plata, Argentina.
- **51st ABTCP International Pulp and Paper Congress and X IberoAmerican Congress on Pulp and Paper Research 2018** "HYDROGELS OF NATURAL POLYELECTROLYTE COMPLEXES FOR DRUG CONTROLLED RELEASE STUDIES" Carla N. Schnell, María Veronica Galván, Miguel A. Zanuttini y Paulina Mocchiutti. Aceptado para presentación oral a realizarse del 23 al 25 de Octubre en Sao Paulo, Brazil.
- **XII Simposio Argentino de Polímeros- SAP 2017** "pH-SENSITIVE HYDROGELS FROM XYLAN/CHITOSAN COMPLEXES FOR DRUG CONTROLLED RELEASE. EFFECTS OF SODIUM CITRATE CROSSLINKING AGENT". Carla N. Schnell, María Veronica

Galván, Miguel A. Zanuttini y Paulina Mocchiutti. Los Cocos, Cordoba, Argentina, Octubre 18-20, 2017.

- **Jornada Celulósico Papeleras 2017**- Realizado los días 17-19 de Mayo de 2017 en Buenos Aires, Argentina. Participación

- **Workshop on Insights and Strategies Towards a Bio-based Economy (I&S)**. “Lignocellulosic Nanofibers (LCNF) combined with Polyelectrolyte Complexes (PECs) as a Strength Additive for Packaging Papers.” Carla N. Schnell, María V. Galván, Paulina Mocchiutti, Joaquín Tarres, Marc Delgado-Aguilar, Miguel A. Zanuttini. Realizado los días 21-25 de noviembre de 2016, Montevideo, Uruguay. (Póster).

- **Workshop on Insights and Strategies Towards a Bio-based Economy (I&S)**. “Films and hydrogels base don Xylans complexes with chitosan”. P. Mocchiutti, M. V. Galván, M.C. Inalbon, C. N. Schnell, F. Fabbroni and M. Zanuttini. Realizado los días 21-25 de noviembre de 2016, Montevideo, Uruguay. (Oral).

- **Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel (CIADICYP)**. “Strengthening of Recycled Paper by Lignocellulosic Nanofibers (LCNF) Assisted by Polyelectrolyte Complexes (PECs)”. Carla N. Schnell, María V. Galván, Joaquín Tarres, Marc Delgado-Aguilar, Miguel A. Zanuttini. Realizado los días 4-8 de septiembre de 2016, Espoo, Finland. (Poster).

- **Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel (CIADICYP)**. Assesment of the suitability of xylan/chitosan based hydrogels for potential biomedical applications”. M. V. Galván, G. E. Ramella, C. N. Schnell, M.A. Zanuttini and P. Mocchiutti. Realizado los días 4-8 de septiembre de 2016, Espoo, Finland. (Oral).

- **XXVIII International Carbohydrate Syposium (I.C.S. 2016)**. “High xylan content biodegradable films for food packaging”. Maria S. Peresin, Carla N. Schnell, María V. Galván, Paulina Mocchiutti, Miguel Á. Zanuttini. Realizado los días 17-22 de julio de 2016, New Orleans, Luisana, USA. (Póster).

- **18th International Symposium on Wood, Fiber and Pulping Chemistry (18th ISWFPC)** “*Polyelectrolyte Complexes of Xylan and Chitosan. Effects of the order of addition and ionic strength*”. Carla N. Schnell, María V. Galván, María S. Peresin, Miguel A. Zanuttini, Paulina Mocchiutti. Viena, Austria, 20-23 Octubre del 2015.

- **XI Simposio Argentino de Polímeros- SAP 2015** “*Caracterización de Films Biodegradables de Xilano y Quitosano*”. Carla N. Schnell, María V. Galván, Paulina Mocchiutti, Gabriel Ramella, Miguel A. Zanuttini. Santa Fe, Argentina, 20-23 Octubre del 2015. (Poster)



CAPÍTULO 8

REFERENCIAS



8. REFERENCIAS

- **Ahola, S., Salmi, J., Johansson, L. S., Laine, J., Österberg, M. (2008).** Model films from native cellulose nanofibrils. Preparation, swelling, and surface interactions. *Biomacromolecules*, 9(4), 1273-1282.
- **Alcalde Boarin, L., Fonseca Graciano, G. (2016).** Alkali process for chitin extraction and chitosan production from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scales. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(4), 683–688.
- **Andrade-Vivero, P., Fernandez-Gabriel, E., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A. (2007).** Improving the loading and release of NSAIDs from pHEMA hydrogels by copolymerization with functionalized monomers. *Journal of pharmaceutical sciences*, 96(4), 802-813.
- **Ankerfors, C. (2008).** Polyelectrolyte complexes: Their preparation, adsorption behaviour, and effect on paper properties. Licenciate Thesis, KTH, Dep. of Fibre and Polymer Technology, Stockholm, Sweden.
- **Ankerfors, C., Lingström, R., Wågberg, L., Ödberg, L. (2009).** A comparison of polyelectrolyte complexes and multilayers: Their adsorption behaviour and use for enhancing tensile strength of paper. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 24(1), 77-86.
- **Ankerfors, C., Wågberg, L. (2014).** Polyelectrolyte complexes in the dispersed and solid state II. Application Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (Chapter 1)
- **Aulin, C., Lindström, T. (2011).** Biopolymer coatings for paper and paperboard. *Biopolymers–New Materials for Sustainable Films and Coatings*, 255-276.
- **Banerjee, P. N., Pranovich, A., Dax, D., Willför, S. (2014).** Non-cellulosic heteropolysaccharides from sugarcane bagasse–Sequential extraction with pressurized hot water and alkaline peroxide at different temperatures. *Bioresource technology*, 155, 446-450.
- **Bastarrachea, L., Dhawan, S., & Sablani, S. S. (2011).** Engineering properties of polymeric-based antimicrobial films for food packaging: a review. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 79-93.
- **Batycky, R. P., Hanes, J., Langer, R., Edwards, D. A. (1997).** A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. *Journal of pharmaceutical sciences*, 86(12), 1464-1477.
- **Berezina, N. (2016).** Production and application of chitin. *Physical Sciences Reviews*, 1(9).
- **Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., Gurny, R. (2004).** Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 19–34.

- **Bergo, P. P., Sobral, P. A. y Prison, J. M. (2010).** Effect of glycerol on physical properties of cassava starch films. *Journal of Food Processing & Preservation*. (34):401-410.
- **Biddy, M. J., Scarlata, C., Kinchin, C. (2016).** Chemicals from biomass: a market assessment of bioproducts with near-term potential (No. NREL/TP-5100-65509). National Renewable Energy Lab.(NREL), Golden, CO (United States).
- **Bolto, B., Gregory, J. (2007).** Organic polyelectrolytes in water treatment. *Water research*, 41(11), 2301-2324.
- **Bourtoom, T. (2008).** Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), 237-248.
- **Brebu, M., Vasile, C. (2010).** Thermal degradation of lignin—a review. *Cellulose Chemistry & Technology*, 44(9), 353.
- **Brienzo, M., Siqueira, A. F., Milagres, A. M. F. (2009).** Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. *Biochemical Engineering Journal*, 46(2), 199–204.
- **Bush, J. R., Liang, H., Dickinson, M., Botchwey, E. A. (2016).** Xylan hemicellulose improves chitosan hydrogel for bone tissue regeneration. *Polymers for advanced technologies*, 27(8), 1050-1055.
- **Caló, E., Khutoryanskiy, V. V. (2015).** Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65, 252-267.
- **Campos, C. A., Gerschenson, L. N. y Flores S. K. (2011).** Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food Bioprocess Technol.* 4:849-875
- **Carvalho, F., Duarte, L. C., Gírio, F. M. (2008).** Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 849-864.
- **Cegnar, M., Kerč, J. (2010).** Self-assembled Polyelectrolyte Nanocomplexes of Alginate, Chitosan and Ovalbumin. *Acta chimica slovenica*, 57(2).
- **Chen, J., Heitmann, J.A., Hubbe, M.A. (2003).** Dependency of polyelectrolyte complex stoichiometric on the order of addition. 1. Effect of salt concentration during streaming current titration with strong poly-acid and poly-base. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 223(1-3), 215-230.
- **Chen, H., Hu, X., Chen, E., Wu, S., McClements, D. J., Liu, S. Li, Y. (2016).** Preparation, characterization, and properties of chitosan films with cinnamaldehyde nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 61, 662-671.
- **Choi, J., Rubner, M. F. (2005).** Influence of the degree of ionization on weak polyelectrolyte multilayer assembly. *Macromolecules*, 38(1), 116-124.

- **Chollakup, R., Beck, J. B., Dirnberger, K., Tirrell, M., Eisenbach, C. D. (2013).** Polyelectrolyte molecular weight and salt effects on the phase behavior and coacervation of aqueous solutions of poly (acrylic acid) sodium salt and poly (allylamine) hydrochloride. *Macromolecules*, 46(6), 2376-2390.
- **Cursaru, B., Teodorescu, M., Boscornea, C., Stanescu, P. O., Stoleriu, S. (2013).** Drug absorption and release properties of crosslinked hydrogels based on diepoxy-terminated poly (ethylene glycol) s and aliphatic polyamines—a study on the effect of the gel molecular structure. *Materials Science and Engineering: C*, 33(3), 1307-1314.
- **Da Cunha Goncalves; Thesis, M. (2011).** Integrated Master in Chemical Engineering Preparation and Evaluation of Material Properties of Biofilms from Spruce Xylan.
- **Dehnad, D., Mirzaei, H., Emam-Djomeh, Z., Jafari, S. M., Dadashi, S. (2014).** Thermal and antimicrobial properties of chitosan–nanocellulose films for extending shelf life of ground meat. *Carbohydrate polymers*, 109, 148-154.
- **Deutschmann, R., Dekker, R. F. (2012).** From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1627-1640.
- **Dobrynin, A. V., Rubinstein, M. (2005).** Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Progress in Polymer Science*, 30(11), 1049-1118.
- **Don, T. M., Huang, M. L., Chiu, A. C., Kuo, K. H., Chiu, W. Y., Chiu, L. H. (2008).** Preparation of thermo-responsive acrylic hydrogels useful for the application in transdermal drug delivery systems. *Materials Chemistry and Physics*, 107(2-3), 266-273.
- **Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., Dutta, J. (2009).** Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food chemistry*, 114(4), 1173-1182.
- **Ebringerova A, Hromadkova Z. (1999).** Xylans of industrial and biomedical importance. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 16:1, 325-346.
- **Eklund, D.; Lindström, T. (1991).** Chapter II. The fibre and its behavior during papermaking. *Paper Chemistry. An Introduction*. Dt. Paper Science Publications. Grankulla, Finland.
- **Eriksson, M., Notley, S. M., Wågberg, L. (2005).** The influence on paper strength properties when building multilayers of weak polyelectrolytes onto wood fibres. *Journal of colloid and interface science*, 292(1), 38-45.
- **Eriksson, M.; Torgnysdotter, A.; Wågberg, L. (2006).** Surface Modification of Wood Fibers Using the Polyelectrolyte Multilayer Technique: Effects on Fiber Joint and Paper Strength Properties. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45, 5279-5286.

- **Eronen P, Österberg M, Heikkinen S, Tenkanen M, Laine J (2011)** Interactions of structurally different hemicelluloses with nanofibrillar cellulose. *Carbohydr Polym* 86:1281–1290
- **Escobar J.L., García D.M., D. Zaldivar, Issa Katime (2002)** "Hidrogeles: principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos". *Revista Iberoamericana Polímeros Volumen* 3(3)
- **Etzler, F.M., Buche, M., Bobalek, J.F.; Weiss, M.A. (1995)**. Surface free energy of paper and inks: printability issues. *Proc. Tappi Papermakers Conf.* TAPPI Press, Atlanta, 383-394
- **European Bioplastics e.V. (2016)**. <https://www.european-bioplastics.org/>
- **Faisant, J. B., Ait-Kadi, A., Bousmina, M., Deschenes, L. (1998)**. Morphology, thermomechanical and barrier properties of polypropylene-ethylene vinyl alcohol blends. *Polymer*, 39(3), 533-545.
- **Fatehi P., Qian L., Kititerakun R., Rirkksomboon T., Xiao H. (2009)**. Complex formation of modified chitosan and carboxymethyl cellulose and its impact on paper properties. *Tappi Journal*, 8 (6); 29-35.
- **Fatehi, P.; Kititerakun, R.; Ni, Y.; Xiao, H. (2010)**. Synergy of CMC and modified chitosan on strength properties of cellulosic fiber network. *Carbohydrate Polymers*. 80, 208-214.
- **Felton, L. A. (2013)**. Mechanisms of polymeric film formation. *International journal of pharmaceutics*, 457(2), 423-427.
- **Ferguson DJ, Schirmer HG, Mueller, WB (1987)**. A Multi-layer packaging film and receptacles made therefrom. Patent US 4640856
- **Feria M. (1997)**. Fármacos analgésicos-antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos. *Antiartríticos*. Flórez J. *Farmacología Humana*. 3era Ed. Madrid-España: Masson, 355-387.
- **Gabrielii, I., Gatenholm, P., Glasser, W.G., Jain, R.K., Kenne, L. (2000)**. Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicellulose from aspen wood. *Carbohydrate Polymers*, 43, 367–374.
- **Galván, M. V., Mocchiutti, P., Schnell, C. N., Liitia, T., Zanuttini, M. A. (2013)**. Dual-adsorption of poly (allylamine hydrochloride) and lignosulfonate onto recycled cellulosic fibers. *Cellulose Chemistry and Technology*, 47(7-8), 631-641.
- **Galván, M.V., Peresin, M.S., Mocchiutti, P., Zanuttini, M.A., Tammelin T. (2015)**. Effects of charge ratios of xylan-poly(allylamine hydrochloride) complexes on their adsorption onto different surfaces. *Cellulose* 527 , 22 (5), 2955-2970.
- **Gärdlund L, Wagberg L, Gernandt R (2003)**. Polyelectrolyte complexes for surface modification of wood fibers. II. Influence of complexes on wet and dry strength of paper. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 218:137–149

- **Gärdlund, L., Forsström, J., Andreasson, B., Wågberg, L. (2005).** Influence of polyelectrolyte complexes on strength properties of papers made from unbleached kraft pulps. *Nord. Pulp. Paper Res. J.* 20, 36-42.
- **Gärdlund, L.; Wågberg, L.; Norgren, M. (2007).** New insights into the structure of polyelectrolyte complexes. *Journal of Colloid and Interface Science.* 312, 237–246.
- **Garrison, T., Murawski, A., Quirino, R. (2016).** Bio-based polymers with potential for biodegradability. *Polymers*, 8(7), 262.
- **Gatenholm, P.; Tenkanen, M. (2004).** Hemicelluloses: Science and Technology. ACS Symposium series 864: Washington, DC.
- **Geyer, R., Jambeck, J. R., Law, K. L. (2017).** Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science advances*, 3(7), e1700782.
- **Gilman, A.G., Ralf, T.W., Nile, A.S., 1991.** *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Vol. 1, Maxwell Publishing, 8th 669
- **Goksu EI, Karamanlioglu M, Bakir U, Yilmaz L, Yilmazer U (2007)** Production and Characterization of Films from Cotton Stalk Xylan. *J. Agric. Food Chem.* 55: 10685-10691.
- **Granqvist, N., Liang, H., Laurila, T., Sadowski, J., Yliperttula, M., & Viitala, T. (2013).** Characterizing ultrathin and thick organic layers by surface plasmon resonance three-wavelength and waveguide mode analysis. *Langmuir*, 29(27), 8561-8571.
- **Gröndahl, M., Eriksson, L., Gatenholm, P. (2004).** Material properties of plasticized hardwood xylans for potential application as oxygen barrier films. *Biomacromolecules*, 5(4), 1528-1535.
- **Gupta P; Vermani K; Garg S (2002).** "Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery" Review. *Drug Discovery Today* 7 (10), 569-579.
- **Gurnagul N., Ju S. y Page D.H. (2001).** Fibre-fibre bond strength of once-dried pulps. *Journal of Pulp and Paper Science.* 27(3), 88-91.
- **Hamman, J. H. (2010).** Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Marine drugs*, 8(4), 1305-1322.
- **Hansen NML, Plackett D (2008).** Sustainable films and coatings from hemicelluloses: a review. *Biomacromolecules* 9(6):1493–1505.
- **Hassan, S. S., Williams, G. A., Jaiswal, A. K. (2019).** Lignocellulosic biorefineries in Europe: Current state and prospects. *Trends in biotechnology*, 37(3), 231-234.
- **Heermann, Maryn; Welter, Sara; Hubbe, Martin (2006).** Effects of high treatment levels in a dry-strenght additive program based on deposition of polyelectrolyte complexes: How much glue is too much? *Processes and Paper magazine* (Vol.89 N°. 6)

- **Heinze, T., Petzold-Welcke, K., van Dam, J. E. (2012).** Polysaccharides: Molecular and supramolecular structures. Terminology. In *The European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE)* (pp. 23-64). Springer, Vienna.
- **Horio, M., Imamura, R. (1964).** Crystallographic study of xylan from wood. *Journal of Polymer Science Part A: General Papers*, 2(2), 627-644.
- **Huang, X., Brazel, C. S. (2001).** On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of controlled release*, 73(2-3), 121-136.
- **Hubbe, M. A., Ayoub, A., Daystar, J. S., Venditti, R. A., Pawlak, J. J. (2013).** Enhanced absorbent products incorporating cellulose and its derivatives: A review. *BioResources*, 8(4), 6556-6629.
- **Hubbe, M. A., Chen, J. (2004).** Charge-related measurements—A reappraisal. Part 1: Streaming current. *Paper Technol*, 45(8), 17-23.
- **Hubbe, M.A.; Jackson, T.L.; Zhang, M. (2003).** Fiber surface saturation as a strategy to optimize dual-polymer dry strength treatment. *Tappi J.* 2(11), 7-12.
- **Hubbe, M. A., Moore, S. M., Lee, S. Y. (2005).** Effects of charge ratios and cationic polymer nature on polyelectrolyte complex deposition onto cellulose. *Industrial & engineering chemistry research*, 44(9), 3068-3074.
- **Hubbe, M.A., Sundberg, A., Mocchiutti, P., Ni, Y., Pelton, R. (2012).** Dissolved and colloidal substances (DCS) and the charge demand of papermaking process waters and suspensions: a review. *BioResources*. 7, 6109-6193.
- **Ikeda, S., Kumagai, H., Sakiyama, T., Chu, C-H. and Nakamura, K. (1995).** Method for Analyzing pH-Sensitive Swelling of Amphoteric Hydrogels—Application to a Polyelectrolyte Complex Gel Prepared from Xanthan and Chitosan. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59(8), 1422-1427.
- **Jeong, B., Bae, Y. H., Kim, S. W. (2000).** Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG–PLGA–PEG triblock copolymers. *Journal of controlled release*, 63(1-2), 155-163.
- **Jiang, X., Chen, L., Zhong, W. (2003).** A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 457-463.
- **Júnior, D. L., Ayoub, A., Venditti, R. A., Jameel, H., Colodette, J. L., Chang, H. M. (2013).** Ethanol precipitation of hetero-polysaccharide material from hardwood by alkaline extraction prior to the kraft cooking process. *Bioresources*, 8(4), 5319-5332.
- **Kabanov, V. A., Zezin, A. B. (1984).** A new class of complex water-soluble polyelectrolytes. *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, 6(S19841), 259-276.

- **Karaaslan, M.A., Tshabalala, M.A., and Buschle-Diller, G. (2010).** Wood hemicellulose/chitosan-based semi-interpenetrating network hydrogels: mechanical, swelling, and controlled drug release properties. *BioResources*, 5(2), 1036-1054.
- **Karaaslan, M. A., Tshabalala, M.A., and Buschle-Diller, G. (2012).** Semi-Interpenetrating Polymer Network Hydrogels Based on Aspen Hemicellulose and Chitosan: Effect of Crosslinking Sequence on Hydrogel Properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 124, 1168–1177.
- **Kayserilioglu, B.S., Bakir, U., Yilmaz, L., Akkas, N (2003).** Use of xylan, an agricultural by-product, in wheat gluten based biodegradable films: mechanical, solubility and water vapor transfer rate properties. *Bioresource Technology* 87, 239–246.
- **Khazaeinia, T., Jamali, F. (2003).** A comparison of gastrointestinal permeability induced by diclofenac-phospholipid complex with diclofenac acid and its sodium salt. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 6(3), 352-9.
- **Kim, S. W., Bae, Y. H., Okano, T. (1992).** Hydrogels: swelling, drug loading, and release. *Pharmaceutical research*, 9(3), 283-290.
- **Kim, K. M., Son, J. H., Kim, S. K., Weller, C. L., Hanna, M. A. (2006).** Properties of chitosan films as a function of pH and solvent type. *Journal of food science*, 71(3), E119-E124.
- **Koetz, J., Kosmella, S. (2007).** Polyelectrolyte and nanoparticles. Springer: Verlag Berlin Hedelberg. pp.36-45.
- **Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., Park, H. J. (2010).** Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology*, 144(1), 51-63.
- **Krone V, Magerstadt M, Walch A, Groner A, Hoffmann D. (1997)** "Pharmacological composition containing polyelectrolyte complexes in microparticulate form and at least on active agent". United States patent, 5,700,459.
- **Krukowski, S., Karasiewicz, M., Kolodziejski, W. (2017).** Convenient UV-spectrophotometric determination of citrates in aqueous solutions with applications in the pharmaceutical analysis of oral electrolyte formulations. *journal of food and drug analysis*, 25(3), 717-722.
- **Kumar MNVR (2000)** "A review of chitin and chitosan applications". *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1-27.
- **Kumar, S., Negi, Y.S. (2014).** Cellulose and Xylan Based Prodrug of Diclofenac Sodium: Synthesis, Physicochemical Characterization and In Vitro Release. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 63, 283–292.

- **Laine, J., Buchert, J., Viikari, L., Stenius, P. (1996).** Characterization of unbleached kraft pulps by enzymatic treatment, potentiometric titration and polyelectrolyte adsorption. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 50(3), 208-214.
- **Lankalapalli, S; Kolapalli, V. R. M. (2009)** "Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology". *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 481-487
- **Lee, H., Son, S. H., Sharma, R., Won, Y. Y. (2011).** A Discussion of the pH-Dependent Protonation Behaviors of Poly (2-(dimethylamino) ethyl methacrylate)(PDMAEMA) and Poly (ethylenimine-ran-2-ethyl-2-oxazoline)(P (EI-r-EOz)). *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(5), 844-860.
- **Lee, K. Y., Park, W. H., Ha, W. S. (1997).** Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(4), 425-432.
- **Li, X., Shi, X., Wang, M., Du, Y. (2011).** Xylan chitosan conjugate-A potential food preservative. *Food Chemistry*, 126(2), 520-525.
- **Lim, S. H., Hudson, S. M. (2004).** Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. *Carbohydrate research*, 339(2), 313-319.
- **Linder, A., Bergman, R., Bodin, A., Gatenholm, P. (2003).** Mechanism of assembly of xylan onto cellulose surface. *Langmuir*, 19, 5072-5077.
- **Lindgren, J., Ohman, L. O., Gunnars, S., Wågberg, L. (2002).** Charge determinations of cellulose fibres of different origin-Comparison between different methods. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 17(1), 89-96.
- **Lloyd, J.A.; Horne, C.W. (1993).** The determination of fibre charge and acidic groups of Radiata pine pulps. *Nordic Pulp Paper Res. J.* 8(1), 48-57.
- **Lofton, M.C., Moore, S.M., Hubbe, M.A., Lee, S.Y. (2005).** Deposition of polyelectrolyte complexes as a mechanism of developing paper dry strength. *Tappi J.* 4(9), 3-7.
- **Luo, Y., Pan, X., Ling, Y., Wang, X., Sun, R. (2014).** Facile fabrication of chitosan active film with xylan via direct immersion. *Cellulose*, 21(3), 1873-1883.
- **Mao, J., Kondu, S., Ji, H. F., McShane, M. J. (2006).** Study of the near-neutral pH-sensitivity of chitosan/gelatin hydrogels by turbidimetry and microcantilever deflection. *Biotechnology and bioengineering*, 95(3), 333-341.
- **Mauer, L.J., Ozen, B.F. (2004).** *Food Packaging*. Scott Smith, J., & Hui, Y.H. (Eds.), Food processing. Principles and Applications. (pp. 120). Iowa: Blackwell Publishing.

- **Meka, V. S., Sing, M. K., Pichika, M. R., Nali, S. R., Kolapalli, V. R., Kesharwani, P. (2017).** A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. *Drug discovery today*, 22(11), 1697-1706.
- **Michaels, A. S., Miekka, R.G. (1961).** Polycation-polyanion complexes: Preparation and properties of poly-(vinylbenzyltrimethylammonium) poly-(styrenesulfonate). *J. Phys. Chem.* 65, 1765-1773.
- **Mikkonen KS, Tenkanen M (2012).** Sustainable food-packaging materials based on future biorefinery products: xylans and mannans. *Trends Foods Sci Technol* 28(2):90–102.
- **Mocchiutti, P., Galván, M.V., Peresin, M.S., Schnell, C.N., Zanuttini, M.A. (2015).** Complexes of xylan and synthetic polyelectrolytes. Characterization and adsorption onto high quality unbleached fibres. *Carbohydrate Polymers*, 116, 131-139.
- **Mohammed, M., Syeda, J., Wasan, K., Wasan, E. (2017).** An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutics*, 9(4), 53.
- **Mori, T., Murakami, M., Okumura, M., Kadosawa, T., Uede, T., Fujinaga, T. (2005).** Mechanism of macrophage activation by chitin derivatives. *Journal of veterinary medical science*, 67(1), 51-56.
- **Muramatsu, M., Okura, M., Kuboyama, K., Ougizawa, T., Yamamoto, T., Nishihara, Y., Saito, Y., Ito, K., Hirata, K. Kobayashi, Y. (2003).** "Oxygen permeability and free volume hole size in ethylene–vinyl alcohol copolymer película: temperature and humidity dependence". *Radiation Physics and Chemistry*, 68, 561–564.
- **Nazhad, M.M; Paszner, L. (1994).** Fundamentals of strength loss in recycled paper. *Tappi Journal*. 77(9), 171-179.
- **Norgren, M., Gärdlund, L., Notley, S. M., Htun, M., Wågberg, L. (2007).** Smooth model surfaces from lignin derivatives. II. Adsorption of polyelectrolytes and PECs monitored by QCM-D. *Langmuir*, 23(7), 3737-3743.
- **Ondaral, S., Kurtuluş, O. Ç., Öztürk, G., Ergün, M. E., Yakın, İ. (2018).** Aldehyde Starch Complexes: Adsorption on Cellulose Model Film and Performance as a Strength Additive for Papermaking. *BioResources*, 13(2), 4470-4483.
- **Orelma, H., Filpponen, I., Johansson, L. S., Laine, J., Rojas, O. J. (2011).** Modification of cellulose films by adsorption of cmc and chitosan for controlled attachment of biomolecules. *Biomacromolecules*, 12(12).
- **Orelma, H. (2012).** Cellulose based bio-interfaces for immunodiagnostic applications.

- **Özdenkçi, K., De Blasio, C., Muddassar, H. R., Melin, K., Oinas, P., Koskinen, J., Järvinen, M. (2017).** A novel biorefinery integration concept for lignocellulosic biomass. *Energy Conversion and Management*, 149, 974-987.
- **Özgüney, I. S., Karasulu, H. Y., Kantarci, G., Sözer, S., Güneri, T., Ertan, G. (2006).** Transdermal delivery of diclofenac sodium through rat skin from various formulations. *AAPS pharmscitech*, 7(4), E39-E45.
- **Papineau, A. M., Hoover, D. G., Knorr, D., Farkas, D. F. (1991).** Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology*, 5(1), 45-57.
- **Peng, X. W., Ren, J. L., Zhong, L. X., Sun, R. C. (2011).** Nanocomposite films based on xylan-rich hemicelluloses and cellulose nanofibers with enhanced mechanical properties. *Biomacromolecules*, 12(9), 3321-3329.
- **Peppas (1997)** Nikolaos A "Hydrogels and drug delivery" *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2, 531-537
- **Pereda, M., Aranguren, M. I., Marcovich, N. E. (2008).** Characterization of chitosan/caseinate films. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(2), 1080-1090.
- **Peresin, M. S., Kammiovirta, K., Setälä, H., Tammelin, T. (2012).** Structural features and water interactions of etherified xylan thin films. *Journal of Polymers and the Environment*, 20(4), 895-904.
- **Pillai, C. K. S., Paul, W., Sharma, C. P. (2009).** Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in polymer science*, 34(7), 641-678.
- **Plackett, D. (2011).** *Biopolymers: new materials for sustainable films and coatings.* John Wiley & Sons.
- **Pontius, F. W. (2016).** Chitosan as a drinking water treatment coagulant. *Journal of Civil Engineering*, 4(5), 205-215.
- **Rathee, V. S., Sidky, H., Sikora, B. J., Whitmer, J. K. (2018).** Role of Associative Charging in the Entropy–Energy Balance of Polyelectrolyte Complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 140(45), 15319-15328.
- **Rinaudo, M., Pavlov, G., Desbrieres, J. (1999).** Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*, 40(25), 7029-7032.
- **Ritthidej, G. C., Phaechamud, T., Koizumi, T. (2002).** Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films. *International journal of pharmaceutics*, 232(1-2), 11-22.

- **Saarinen T, Österberg M, Laine J (2008)**. Adsorption of poly-electrolyte multilayers and complexes on silica and cellulose surfaces studied by QCM-D. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 330:134–142
- **Sano, H., Shibasaki, K. I., Matsukubo, T., Takaesu, Y. (2003)**. Effect of chitosan rinsing on reduction of dental plaque formation. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, 44(1), 9-16.
- **Scarano, S., Mariani, S., Minunni, M. (2016)**. Label free Affinity sensing: application to food analysis. *Acta Imeko*, 5(1), 36-44.
- **Schatz, C., Domard, A., Viton, C., Pichot, C., Delair, T. (2004)**. Versatile and efficient formation of colloids of biopolymer-based polyelectrolyte complexes. *Biomacromolecules*, 5(5), 1882-1892.
- **Scott, R. W. (1979)**. Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials. *Analytical Chemistry*, 51(7), 936–941.
- **Shi, R., Bi, J., Zhang, Z., Zhu, A., Chen, D., Zhou, X., Tian, W. (2008)**. The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of the polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperature. *Carbohydrate polymers*, 74(4), 763-770.
- **Shu X.Z.; Zhu K.J.; Weihong Song (2001)**. "Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release". *International Journal of Pharmaceutics* 212, 19-28
- **Šimkovic, I., Tracz, A., Kelnar, I., Uhliariková, I., Mendichi, R. (2014)**. Quaternized and sulfated xylan derivative films. *Carbohydrate polymers*, 99, 356-364.
- **Sjöström, E. (1993)**. *Wood Chemistry. Fundamentals and Applications*. Second Edition. Academic Press Inc., San Diego, California.
- **Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001)**. *Principios de análisis instrumental* (No. 543.4/. 5). McGraw-Hill Interamericana de España.
- **Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. (2008)**. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory analytical procedure*, 1617, 1-16.
- **Sothornvit, R. U. N. G. S. I. N. E. E. (2015)**. Edible films and coatings for packaging applications. *Polymers Pack Appl*, 197-228.
- **Spruijt, E. (2012)**. Strength, structure and stability of polyelectrolyte complex coacervates. PhD thesis, Wageningen University, The Netherlands.
- **Stefanescu, C., Daly, W. H., Negulescu, I. I. (2012)**. Biocomposite films prepared from ionic liquid solutions of chitosan and cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 435-443.
- **Stepan, A. (2013)**. *Bioplastics from Biomass-Acetylation of Xylans with Green Chemistry*. Chalmers University of Technology.

- **Stokke, D. D., Wu, Q., Han, G. (2013).** Introduction to wood and natural fiber composites. John Wiley & Sons.
- **Sun, X. F., Wang, H. H., Jing, Z. X., Mohanathas, R. (2013).** Hemicellulose-based pH-sensitive and biodegradable hydrogel for controlled drug delivery. *Carbohydrate polymers*, 92(2), 1357-1366.
- **Svärd, A., Brännvall, E., Edlund, U. (2017).** Rapeseed straw polymeric hemicelluloses obtained by extraction methods based on severity factor. *Industrial Crops and Products*, 95, 305–315.
- **Tammelin T, Saarinen T, O'sterberg M, Laine J (2006).** Preparation of Langmuir/Blodgett-cellulose surfaces by using horizontal dipping procedure. Application for polyelectrolyte adsorption studies performed with QCM-D. *Cellulose* 13(5):519–535
- **Tan W-H., Takeuchi S. (2007).** Monodisperse Alginate Hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation. *Adv. Mater.*, 19, 2696–2701.
- **Tanodekaew, S., Prasitsilp, M., Swadison, S., Thavornytikarn, B., Pothsree, T., Pateepasen, R. (2004).** Preparation of acrylic grafted chitin for wound dressing application. *Biomaterials*, 25(7-8), 1453-1460.
- **Tarvainen, T., Svarfvar, B., Åkerman, S.A., Savolainen, J., Karhu, M., Paronen, P., and Järvinen, K. (1999).** Drug release from a porous ion-exchange membrane in vitro. *Biomaterials*, 20, 177-2183.
- **Terayama, H. (1952).** Method of colloid titration (a new titration between polymer ions). *Journal of Polymer Science*, 8(2), 243-253.
- **Testova, L., Roselli, A., Costabel, L., Kovasin, K., Tenkanen, M., Sixta, H. (2014).** Combined production of polymeric birch xylan and paper pulp by alkaline pre-extraction followed by alkaline cooking. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53(19), 8302-8310.
- **Wågberg, L, Forsberg, S., Johansson, A., Juntti, P (2002).** Engineering of fibre surface properties by application of the polyelectrolyte multilayer concept. Part I: Modification of paper strength. *JPPS*. 28, 222-228.
- **Wågberg, L; Odberg, L; Glad-Nordmark, G. (1989).** "Charge determinations of porous substrates by polyelectrolyte adsorption". *Nord. Pulp Pap. Res. J.* 4(2),71
- **Wang H., C. Qian, M. Roman (2011).** Effects of pH and salt concentration on the formation and properties of chitosan-cellulose nanocrystal polyelectrolyte-macroion complexes, *Biomacromolecules*. 12(10) 3708-3714.
- **Wang, S., Ren, J., Li, W., Sun, R., Liu, S. (2014).** Properties of polyvinyl alcohol/xylan composite films with citric acid. *Carbohydrate polymers*, 103, 94-99.

-
- **Winnik, M. A. (1997).** Latex film formation. *Current opinion in colloid & interface science*, 2(2), 192-199.
 - **Yadav, P., Yadav, H., Shah, V. G., Shah, G., Dhaka, G. (2015).** Biomedical biopolymers, their origin and evolution in biomedical sciences: A systematic review. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 9(9), ZE21.
 - **Zaldívar, D., Péniche, C., Gallardo, A., San Román, J. (1993).** Biocompatible hydrogels of controlled hydrophobicity from copolymers of N-vinyl-2-pyrrolidone and furfuryl methacrylate. *Biomaterials*, 14(14), 1073-1079.