



**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**Nuevos derivados de quitosano
funcionalizados en el grupo amino,
de alto valor añadido**

Sorel Alexandervich Jatunov Santamaría
Sevilla, 2015



**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

Vº Bº de la Directora de la Tesis

Fdo. Dra. Francisca Cabrera Escribano
Profesora Titular
Departamento de Química Orgánica
Universidad de Sevilla

AGRADECIMIENTOS

No podría empezar estos agradecimientos sin mencionar los principales protagonistas de este doctorado: mis padres, quienes me dieron la oportunidad y la confianza para venir a España y continuar con mi formación académica, apoyándome económicamente y moralmente en cada etapa que lo necesite desde finales del 2009 hasta el 2015 y sin cuya acción determinante no hubiese concluido el proceso de investigación y escritura de la tesis. Su constante preocupación desveló siempre ese papel fundamental que ha tenido mi familia en levantarme en cada etapa en la que he tenido dificultades.

A mi hermano, por sus consejos, recursos, libros, ayuda y ánimo que me ha imprimido en mí en esta etapa del doctorado.

Estando en España he hecho muy buenos amistades y por tanto expresar una serie de agradecimientos. A Hernán, mi primer amigo Sevillano por sus consejos, ayuda y con el que pude pasar algunos momentos familiares. Como primeros compañeros de piso, Bader y Abdel Khader con los cuales he mantenido la amistad y por los cuales conocí muchos otros estudiantes de Marruecos que han cursado en la Universidad de Sevilla

A alguien que fue un compañero de piso especial: Javier López del Valle, por todos los momentos que hemos compartido juntos hablando español e inglés, para mí la “cultura española hecha persona”, con la comida, el fútbol, las anécdotas, la ruta del mosto en Sanlúcar Barrameda, etc.

En el plano del quehacer diario y en el motivo primario de mi estancia en Sevilla mis agradecimientos a mi directora de Tesis la Dra. Francisca Cabrera Escribano, por su ayuda dispensada desde el 22 de diciembre del 2009, por la oportunidad que me otorgó de estar en su laboratorio y lo que esto implica: formar parte de un grupo de investigación, ir a congresos, talleres, utilizar diversos recursos tanto en el laboratorio como los ofrecidos por el CITIUS (RMN, servicio de microscopía, espectrometría de masas, Caracterización funcional, etc.), recibir la beca del AECID entre el 2011 y el 2014, mi estancia en el Instituto de Química Molecular en Reims, Francia y por la ayuda durante todo el proceso de Máster-Doctorado.

A todos los que fueron mis compañeros de Laboratorio, y en especial los que han estado en los últimos años: Antonio Franconetti, Pedro y Lidia,

porque a través de la convivencia y experiencia en el laboratorio se aprende a ser mejor persona e investigador.

A Yolanda, Inmaculada y Aurora por su amable ayuda y para algunas dudas que tuve en el plano de la organocatálisis.

A Sergio por su amabilidad, carisma, charlas amenas, y por los diversos partidos de fútbol que jugamos.

A todos los breakdancers en el paseo Francisco Molina en la que aprendimos que no hay día malo sino malas actitudes. A Willi y Antonio de la Federación Andaluza de Gimnasia por enseñarme a hacer las dobles mortales.

A todos los estudiantes del Departamento de Química Orgánica que un momento u otro mostraron amabilidad y pudieron asistirme en lo que necesitaba.

A Juan Manuel y Modesto en Microbiología y el servicio de Biología del CITIUS, respectivamente, por toda su asistencia para hacer los ensayos antimicrobianos.

A Rosario Fernández, como Directora del Departamento de Química Orgánica, por su labor y la oportunidad que me ofreció para poder estar fines de semana en el Departamento y por su gestión

Al profesor José María Bolaños, “la enciclopedia andante” que me transmitió muchos de sus conocimientos históricos, etimológicos, químicos y culturales que hacen que uno aprecie más el entorno en el que uno vive. Al profesor Óscar López por resolver varias de mis dudas durante la última parte del desarrollo del doctorado y por su amabilidad desde que entre a la facultad de Química Orgánica.

A Christophe Bliard, además de su contribución científica en mi estancia en Reims, Francia, por su amistad y por algunas de sus frases como “sometimes better is enemy of good” o cuando me mostró el “Champagne Bliard”.

En ingeniería, a Paco, por las contribuciones del material CS1 y CS2 en esta tesis, como Alberto Romero con las propiedades mecánicas de films y concentración crítica micelar.

Al profesor Rafael Prado Gotor por su apoyo en el tema de la fluorescencia -quitosano y además por ser una excelente persona, colega y amigo.

A mi compañera sentimental Anisoara por aportarme esa parte afectiva que necesité en la última parte de la escritura de la tesis.

A Alexis excelente amigo colombiano, con el que realicé un viaje por las carreteras convencionales de Francia, Suiza y Alemania, y el que recordará con humor las palabras L'Estaque y "todo negativo" en la Aduana suiza.

A mi amiga María del Socorro, por el sancocho y por aportarme una herramienta excelente por el que puede preparar los antecedentes del capítulo de las nanopartículas.

Este viaje a España no ha sido solo una oportunidad para mi formación académica, sino que ha abierto una puerta para conocer la cultura Europea, que siempre admiré por sus logros en las ciencias, artes y en la música. Quisiera dar gracias a todos los que en el pasado contribuyeron para hacer este viaje realidad. Gracias!!

Índice General	1
----------------	---

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	5
RESUMEN/SUMMARY	15
INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS	28
QUITINA Y QUITOSANO	31
CONTEXTUALIZACIÓN Y MOTIVACIONES	38
OBJETIVOS	43
RELACIÓN DE COMPUESTOS	45
CAPITULO 1 NUEVOS DERIVADOS ANFIFÍLICOS DE QUITOSANO CON FUNCIONALIDAD DE AMIDA Y DE 1,2-HIDROXILAMINA	51
1.1 Antecedentes	53
1.2 Resultados y Discusión	59
1.2.1 <i>Nuevos derivados fluorescentes glucosamina-cumarina.</i>	59
1.2.2 <i>Preparación de nuevos sistemas fluorescentes quitosano-cumarina mediante reacciones de amidación.</i>	68
1.2.3 <i>Preparación de nuevas 1,2-hidroxilaminas derivadas de quitosano mediante reacciones de apertura de epóxidos.</i>	79
CAPITULO 2 IMINAS Y AMINAS SECUNDARIAS DERIVADAS DE QUITOSANO	91
2.1 Antecedentes	93
2.2 Resultados y Discusión	96
2.2.1 <i>Formación de bases de Schiff y aminas secundarias derivadas de quitosano</i>	96
2.2.2 <i>Caracterización de bases de Schiff y aminas secundarias derivadas de quitosano por FTIR</i>	99

Índice General	2
2.2.3 Caracterización de aminas secundarias derivadas de quitosano por ^1H RMN	100
2.2.4 Caracterización de bases de Schiff y aminas secundarias derivadas de quitosano por ^{13}C CPMAS RMN	102
2.2.5 Comparación de los DS calculados mediante RMN en solución y en estado sólido	105
2.2.6 Reacción simultánea de diferentes aldehídos con quitosano	107
2.2.7 Propiedades fotofísicas y detección de polaridad	111
2.2.8 Reacción de acoplamiento de polisacárido polimatosídico en quitosano a través de aminación reductiva.	115
3 CAPITULO 3. UREAS DERIVADAS DE QUITOSANO	118
3.1 Antecedentes	120
3.2 Resultados y discusión	123
3.2.1 Reacción de isocianatos y diisocianatos con 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranososa	123
3.2.2 Reacción de quitosano con isocianatos y diisocianatos.	127
3.2.3 Caracterización de las ureas derivadas de quitosano mediante FT-IR.	128
3.2.4 Caracterización de las ureas derivadas de quitosano mediante ^{13}C CPMAS RMN en estado sólido.	140
4 CAPITULO 4. FORMACIÓN DE DERIVADOS DE QUITOSANO CUATERNIZADOS	145
4.1 Antecedentes	147
4.2 Resultados y Discusión	153
4.2.1 Cuaternización de quitosano y derivados de quitosano con cloruro de glicidiltrimetilamonio (GTMAC).	153
4.2.2 Caracterización de los derivados cuaternizados mediante FT-IR.	156

Índice General	3
4.2.3 <i>Caracterización de los derivados cuaternizados de quitosano mediante ¹H RMN.</i>	158
4.2.4 <i>Caracterización de la urea cuaternizada 35 mediante ¹³C CPMAS RMN.</i>	167
5 CAPITULO 5. APLICACIONES	171
5.1 Formación de Films a partir de Quitosano y de sus derivados	172
5.1.1 <i>Antecedentes</i>	172
5.1.2 <i>Resultados y Discusión</i>	176
5.1.2.1 Análisis de los films de quitosano y sus derivados mediante FT-IR.	178
5.1.2.2 Solubilidad de los films de quitosano y sus derivados.	180
5.1.2.3 Propiedades mecánicas de films derivados de quitosano.	181
5.2 Actividad Antimicrobiana de Quitosano y Derivados de Quitosano	193
5.2.1 <i>Antecedentes</i>	193
5.2.2 <i>Resultados y Discusión</i>	197
5.2.2.1 Actividad antimicrobiana en disolución.	197
5.2.2.2 Actividad antimicrobiana en Films y Sólidos	202
5.3 Formación de nanopartículas y geles de quitosano y sus derivados	206
5.3.1 <i>Antecedentes</i>	206
5.3.2 <i>Resultados y Discusión</i>	216
5.3.2.1 Nanopartículas quitosano/TPP y nanopartículas fluorescentes cumarina-quitosano/TPP.	217
5.3.2.2 Formación de geles de quitosano-nanopartículas GT	223
6 CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	229
Conclusiones	231
7 PARTE EXPERIMENTAL	243
7.1 MÉTODOS GENERALES.	245

Índice General	4
7.2 MATERIAS PRIMAS	251
7.2.1 <i>Síntesis de materias primas.</i>	252
7.3 Parte Experimental. Capítulo 1. Nuevos derivados anfífilos de quitosano con funcionalidad de amida y de 1,2-hidroxilamina.	261
7.4 Parte Experimental. Bases de Schiff y aminas secundarias derivadas de quitosano como sensores potenciales / Formación de iminas y aminas secundarias derivadas de quitosano	268
7.5 Parte Experimental. Reacciones de formación de ureas derivadas de quitosano	283
7.6 Parte Experimental. Reacciones de formación de ureas derivadas de quitosano	289
7.7 Parte Experimental Formación de derivados de quitosano cuaternizados	295
7.8 Parte Experimental. Aplicaciones	300
7.8.1 <i>Preparación de films de quitosano.</i>	300
7.8.2 <i>Actividad antimicrobiana.</i>	305
7.8.3 <i>Formación de nanopartículas.</i>	308
7.8.4 <i>Ensayos de formación de geles a partir de reacciones entre GT con AT o GT con quitosano.</i>	309

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

[α]	Rotación óptica específica
Å	Ångström
ac	Acuoso
Ac.	Ácido
Ac	Acetilo
Ar	Arilo o Argón
AT	Nanopartículas basadas en APTMS y TMOS
APTMS	3-Aminopropil trimetoxisilano
br	Señal ancha
c	Cuartete
c.c.f.	Cromatografía en capa fina
CMC	Critical micelle concentration (concentración crítica micelar)
COSY	Correlated Spectroscopy
cP	centipoise
CP	Cross Polarization (Polarización Cruzada)
d	Doblete
DA	Grado de acetilación
DCC	Diclicohexilcarbodiimida
dd	Doble doblete
DD	Grado de desacetilación
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Grado de sustitución
DQ	Grado de cuaternización

EB	Elongación a rotura (Elongation at break)
EDCI	Hydrocloruro de 1-(3-dimetilelpropil)-3-etilcarbodiimida
ETC	Epóxido de transcariofileno.
FABMS	Espectrometría de masas de bombardeo rápido
GTMAC	Cloruro de glicidiltrimetilamonio
GlcN _{cuat}	Monómero de glucosamina <i>N</i> -cuaternizado.
GlcNR _{urea}	Monómero de glucosamina <i>N</i> -sustituido en el que se ha formado la urea
GT	Nanopartículas basadas en GPTMS y TMOS
GPTMS	3-Glicidiloxipropil trimetoxisilano.
CIHRMS	Espectrometría de masas de alta resolución de ionización química
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HPLC/SEC	Cromatografía líquida de alta presión acoplada a la cromatografía de exclusión por tamaño.
Hz	Hertzios
IR	Infrarrojo
FTIR	Infrarojo con transformada de Fourier
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kV	Kilovoltios
M	Molar
m	Multiplete
m/z	Relación masa/carga
M ⁺	Ión molecular
MAS.	Magic Angle Spinning (Giro bajo Ángulo Mágico)

mbar	Milibar
MHz	Megahertzios
MIC	Concentración inhibitoria mínima Minimum
min	Minuto
mM	Milimolar
mmol	Milimol
M_n	Peso molecular en número
MS	Mass Spectrometry
ms	Milisegundo
M_w	Peso molecular en peso
nm	Nanómetro
NMP	(<i>N</i> -metil-2pirrolidona)
PD	Polidispersión
p.f.	Punto de fusión
Ph	Fenilo
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
Py	Piridina
q	quintuplete
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
Rto.	Rendimiento
s	Singulete
SEM	Scanning electron microscope (Microscopia electrónica de barrido)
t.a.	Temperatura ambiente

TEM	Transmission electron microscopy Microscopia de transmisión electrónica
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Thin layer chromatography
TMS	Tetrametilsilano
TMOS	tetrametoxisilano
TPP	Tripolifosfato sódico
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda
ν_{\max}	Número de onda

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN/SUMMARY

La presente Tesis Doctoral es una contribución al avance de la química del quitosano como una vía de valorización y aprovechamiento de los residuos de cangrejo rojo *Procambarus clarkii* generados en las Marismas del Guadalquivir. Consta de cinco capítulos bien diferenciados, de los cuales los cuatro primeros tienen como objetivo común el desarrollo de nuevos derivados *N*-sustituidos de quitosano que por sus propiedades físico-químicas puedan tener aplicación práctica en distintos campos. La unidad activa que a través de una función puente determinada unimos al esqueleto polimérico es responsable o modula esas propiedades, en cada caso. El quinto capítulo explora aplicaciones bio- y tecnológicas concretas, en particular actividad antimicrobiana y capacidad para generar nanopartículas, films y geles, del propio quitosano y de algunos de sus nuevos derivados.

En el primer capítulo, titulado “*Nuevos derivados anfifílicos de quitosano con funcionalidad de amida y de 1,2-hidroxilamina*” se describe la preparación de derivados fluorescentes conteniendo un puente de amida a partir de quitosanos de bajo peso molecular **CS4** ($M_w = 87875 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, DD = 86%) o **CS5** ($M_w = 97600 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, DD = 87%) y distintas cumarinas funcionalizadas (ácido 3-carboxicumarínico, ácido 7-hidroxycumarin-4-il-acético, ácido 7-dietilaminocumarin-3-il-carboxílico). El 7-hidroxycumarinil derivado de quitosano exhibió alta intensidad de emisión de fluorescencia a bajo grado de sustitución (DS 6.7%). Un sensor de cambios de pH, con interesantes propiedades UV y de fluorescencia, con detección exquisita entre pH 1.0 a 7.0, se preparó por reacción de quitosano ácido 7-dietilaminocumarin-3-il-carboxílico. Reacciones modelo entre clorhidrato

de 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranososa y los ácidos 3-carboxicumarínico y 7-hidroxycumarin-4-il-acético se realizaron previamente para optimizar las condiciones de reacción y facilitar el análisis por espectroscopía de los derivados de quitosano. También se sintetizó un derivado fluorescente quitosano-cumarina con funcionalidad puente de 1,2-hidroxilamina mediante apertura quimioselectiva del anillo de oxirano del (2,3-epoxipropoxi)cumarina por el grupo amino del quitosano y se estudió la regioselectividad del proceso por 2D ^1H - ^1H COSY. El mismo tipo de funcionalidad puente existe en el nuevo derivado de quitosano que se obtuvo mediante apertura nucleofílica del (-)óxido de cariofileno por el grupo amino. Se ha demostrado la capacidad de este derivado y de algunos de los derivados cumarina-quitosano sintetizados para formas micelas en agua y calculado la concentración micelar crítica en cada caso.

El DS de los distintos derivados de quitosano preparados se determinó por ^1H RMN y osciló entre 6.7 y 42.0 %. Los M_n y M_w de los derivados estudiados mediante HPLC/SEC fueron mayores que los de los quitosanos de partida utilizados, lo que indica que los procesos de preparación empleados transcurren sin degradación de la cadena polimérica.

El segundo capítulo bajo el título “*Iminas y aminas secundarias derivadas de quitosano*” describe, en primer lugar, la preparación de una variedad de los derivados de quitosano del título con propiedades fluorescentes y/o antimicrobianas bajo condiciones muy suaves por reacción, en suspensión metanólica acidificada, del quitosano de bajo peso molecular **CS5** (M_w 97600 g mol $^{-1}$, DD = 87%) con aldehídos aromáticos (4-*N,N*-difenilaminobenzaldehído, bifenil-4-carboxaldehído, 4-nitrobenzaldehído, 4-hidroxibenzaldehído, 4-*N,N*-dimetilamino-1-naftaldehído, 1-pirencarboxaldehído).

Se incluye un estudio sin precedentes para la evaluación del grado de *N*-sustitución (DS) utilizando ^{13}C CPMAS RMN en las bases de Schiff derivadas de quitosano (DS comprendidos entre el 12.0 y el 31.7%), como es requerido por la conocida inestabilidad de la función imino en soluciones ácidas. Una correlación lineal entre los DS obtenidos para las aminas secundarias derivadas de quitosano mediante ^1H RMN (10.2 a 55.3%) y los obtenidos por ^{13}C CPMAS RMN (13.8 a 34.4%) nos ha permitido calcular un factor de correlación empírico que podría ser aplicado en otros sistemas aromáticos basados en quitosano.

La reacción simultánea de varios aldehídos con quitosano fue exitosamente llevada a cabo y los resultados de DS de cada una de las unidades incorporadas fueron apoyados/justificados por estudios cinéticos.

También se realizó, en colaboración con el Prof. C. Bliard del Institut de Chimie Moléculaire de Reims” CNRS-UMR (Francia), la aminación reductiva del quitosano **CS4** con un polisacárido polimaltosídico altamente cristalino, como una forma de obtener una presentación multivalente de un polímero sobre el esqueleto de otro polímero.

Algunos de los derivados sintetizados fueron fluorescentes. Los derivados de quitosano nuevos emiten fluorescencia con alta intensidad y estabilidad. Su uso como sensores de polaridad se exploró con la base de Schiff obtenida por reacción del quitosano con el bifenil-4-carboxaldehído, encontrándose que la adición de pequeñas cantidades de disolvente no polar como el diclorometano, provocaba drásticos cambios en la longitud de onda e intensidad de la emisión. Este comportamiento como sensor fluorescente de polaridad, unido a la quiralidad del esqueleto polimérico y a la posibilidad de modular el comportamiento fluorescente variando la

naturaleza del aldehído de partida utilizado, permite esperar que estos nuevos polímeros tengan aplicación como sensores polivalentes en sistemas biológicos.

Se determinó el M_w y M_n de las aminas secundarias derivadas de quitosano por HPLC/SEC. Los valores de pesos moleculares de los obtenidos para estos derivados respecto a los quitosanos de partida confirmaron que las condiciones de preparación utilizadas no degradan la cadena polimérica.

En el tercer capítulo, relativo a “*Ureas derivadas de quitosano*” se prepararon dos tipos de derivados a partir de quitosano de bajo peso molecular **CS4**: ureidil derivados por reacción del biopolímero con isocianatos (fenilisocianato, 3,5-dimetilfenilisocianato y 4-bifenililicocianato) y derivados de quitosano entrecruzados a partir de quitosano y diisocianatos [4,4'-metilenbis(fenilisocianato), hexametil diisocianato)]. Previamente, para establecer las condiciones óptimas de reacción se llevaron a cabo las reacciones modelo correspondientes del clorhidrato de 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranososa con los mismos isocianatos y diisocianatos.

La ausencia de la banda del carbamato a 1700 cm^{-1} en FTIR, la información proporcionada por ^1H RMN, 2D ^1H - ^1H COSY, las condiciones de reacción, y la insolubilidad de los productos en disolventes orgánicos confirman la ausencia de *O*-sustitución en la reacción entre quitosano y los distintos isocianatos. Los DS de los derivados de quitosano preparados en este capítulo oscilan entre 5.8 y 29.2% (determinados por ^1H RMN).

El cuarto capítulo, “*Formación de derivados de quitosano cuaternizados*” describe en primer lugar la cuaternización de los quitosanos de bajo peso molecular **CS3** ($M_w = 86352 \text{ g mol}^{-1}$, DD = 86%) y **CS4** con cloruro de glicidiltrimetilamonio (GTMAC), en condiciones neutras en H_2O para el quitosano **CS4** y en condiciones ácidas a $\text{pH} = 3.7$ para el quitosano **CS3**. Estos derivados cuaternizados fueron solubles hasta $\text{pH} 11$ y 12 respectivamente.

El estudio de la regioselectividad de la sustitución/apertura nucleófila se realizó con la ayuda de los espectros ^1H RMN en tres distintos disolventes deuterados y de los espectros 2D ^1H - ^1H COSY de los productos sintetizados en las distintas condiciones. Se obtuvo primordialmente para ambos tipos de condiciones de reacción el ataque del nucleófilo sobre el carbono menos sustituido del oxirano GTMAC.

Con el fin de cuaternizar algunos de los nuestros nuevos derivados *N*-sustituídos de quitosano se siguieron dos estrategias diferentes. La primera, consistente en la cuaternización del derivado *N*-sustituido ya obtenido, se ensayó con éxito mediante la reacción de la urea obtenida a partir de quitosano y 3,5-dimetilfenil isocianato, con GTMAC. La segunda, utiliza un quitosano de partida cuaternizado de los descritos en el párrafo anterior, al cual se somete al proceso de *N*-sustitución deseado. Esta segunda estrategia se ensayó en la aminación reductiva entre el quitosano **CS3** cuaternizado en condiciones ácidas y el 4-hidroxibenzaldehído, también con el resultado deseado. La solubilidad en medio ácido diluido de la urea cuaternizada aumentó con respecto a la urea de partida y la amina secundaria cuaternizada fue soluble en medio ácido, H_2O y en medio básico hasta pH

12. Los DQ obtenidos para los distintos productos preparados en este capítulo están en el rango de 33.8 a 63.5 %.

La realización de filtros de difusión en RMN nos ha permitido demostrar que la base de Schiff resultante de la reacción entre el quitosano **CS3** cuaternizado y el 4-hidroxibenzaldehído no es estable en D₂O.

Dentro del capítulo 5 bajo el título “*Aplicaciones*” se describe, en primer lugar, la preparación de *films* a partir de distintas muestras de quitosano de peso molecular bajo y medio: **CS1** ($M_w = 42400 \text{ g mol}^{-1}$, DD = 87 %), **CS3** ($M_w = 86352 \text{ g mol}^{-1}$, DD = 86%) y **CS6** ($M_w = 160253 \text{ g mol}^{-1}$, DD = 83%) por *casting* en microondas con ciclos de calentamiento y enfriamiento. La formación de films tiene lugar en 40 minutos, procedimiento mucho más rápido que otros métodos de secado descritos (48-72 horas). Además, se prepararon films de derivados de quitosano a partir de los films de quitosano previamente preparados como se ha indicado más arriba, mediante tratamiento de éstos con 4-nitrobenzaldehído, 4-hidroxibenzaldehído o bifeníl-4-carboxaldehído. Se han caracterizado los films preparados por análisis de sus propiedades mecánicas y por FTIR.

Algunos de los films obtenidos por irradiación con microondas son más resistentes (Módulo de Young = 3360-5129 MPa y TS = 45.5-61.7 MPa) que los hasta ahora descritos en la literatura a partir de quitosano y poseen mayor rigidez (%EB = 2.3-2.8).

En un segundo apartado dentro de este capítulo se ha investigado la actividad antimicrobiana de algunos de los biomateriales basados en quitosano que hemos preparado frente a tres tipos de bacterias Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Salmonella typhimurium*, obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipos. Los

ensayos microbiológicos sobre estas bacterias se realizaron en platos de agar con quitosano o aminas secundarias derivadas de quitosano en solución, films o como sólidos. El quitosano **CS1** en disolución presentó alta capacidad de inhibición frente a *S. typhimurium* y *E. coli* y la amina secundaria derivada de quitosano resultante de la reacción del biopolímero con bifenil-4-carboxaldehído, en estado sólido presentó actividad antibacteriana sobre los tres tipos de bacterias analizados, mostrando en disolución altos valores del % de inhibición en todos los casos (100, 98.0 y 92.5, para *S. typhimurium*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, respectivamente).

En tercer lugar en este capítulo, durante una estancia realizada dentro del grupo del Prof. C. Bliard, se ha hecho un estudio comparativo de la preparación de nanopartículas de quitosano por el procedimiento de gelación iónica con tripolifosfato de sodio en 1 % CH_3COOH y en tampón 0.1 M NH_4OAc /0.2 M CH_3COOH obteniéndose mayor cantidad de nanopartículas, con tamaños más homogéneos, y menor tamaño para la misma relación quitosano:TPP al utilizar el tampón 0.1 M NH_4OAc /0.2 M CH_3COOH , aunque con menor potencial zeta que las preparadas en 1 % CH_3COOH .

Además, se han preparado nanopartículas del derivado de la reacción entre quitosano **CS5** y el ácido 7-hidroxycumarin-4-il-acético y entrecruzando con TPP en tampón 0.1 M NH_4OAc /0.2 M CH_3COOH . Las nanopartículas de menor tamaño fueron en este caso de 168 nm. Se correlacionó el tamaño de partícula con la emisión de fluorescencia, obteniéndose menor fluorescencia a menor tamaño. Por tanto, este derivado cumarínico origina no sólo micelas en agua, como ya se describió en el capítulo 1, sino también nanopartículas fluorescentes con la posibilidad de

calcular el tamaño de las nanopartículas en base a su fluorescencia con una curva de calibración.

Finalmente, se ha explorado el proceso de formación de geles híbridas orgánicas e inorgánicas basado en la reacción entre nanopartículas de siloxano y quitosanos de bajo peso molecular (**CS1** y **CS3**). A través de diversos ensayos utilizando diferentes reactivos como nanopartículas preparadas a partir de 3-glicidiloxipropil trimetoxisilano y tetrametoxisilano (nanopartículas **GT**), nanopartículas preparadas a partir de 3-aminopropil trimetoxisilano y tetrametoxisilano (nanopartículas **AT**) y glutaraldehído, se han optimizado las condiciones para la formación de geles entre los quitosanos mencionados y partículas **GT**, lo que nos ha llevado a concluir que el proceso de gelificación en estos casos es claramente dependiente del pH y de la temperatura.

Summary

This PhD Thesis aims to contribute to the progress of chitosan chemistry as a way of valuing and profiting from wastes generated by the red crab *Procambarus clarkii* in the Guadalquivir's Marshes. It comprises five well-differentiated chapters, in which the first four have the common objective of developing new *N*-substituted chitosan derivatives that could have practical applications in different fields because of their physical-chemical properties. The active unit that is bound to the polymeric backbone through a bridge function is responsible or modulates these properties, in each case. The fifth chapter explores concrete biotechnological applications, in particular the antimicrobial activity and the capacity of chitosan and some of its derivatives of generating nanoparticles, films, and gels.

The first chapter, entitled “*New amphiphilic chitosan derivatives with amide and 1,2 hydroxylamine functionality*”, describes the preparation of fluorescent derivatives containing an amide bridge from low molecular weight chitosan **CS4** ($M_w = 87875 \text{ g mol}^{-1}$, DD = 86%) or **CS5** ($M_w = 97600 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, DD = 87%) and different functionalized coumarins (3-carboxycoumarinic acid, 7-hydroxycoumarin-4-yl-acetic acid, 7-diethylaminocoumarin-3-yl-carboxylic acid). The 7-hydroxycoumarinyl chitosan derivative exhibited high fluorescence emission intensity at low degree of substitution (6.7%). A pH sensor, with interesting UV and fluorescence properties, with an exquisite detection between pH 1.0-7.0, was prepared by the reaction of chitosan with 7-diethylaminocoumarin-3-yl-carboxylic acid. Model reactions between 1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-amino-2-desoxy- β -D-glucopyranose hydrochloride and the 3-carboxycoumarinic and

7-hydroxycoumarin-4-yl-acetic acid were carried out previously to optimize reaction conditions and facilitate analysis by spectroscopy of chitosan derivatives. It was also synthesized a fluorescent chitosan-coumarin derivative with a 1,2 hydroxylamine bridge functionality by a chemoselective opening of the oxirane ring of (2,3-epoxipropoxy)coumarin by the amino group of chitosan and the regioselectivity of the process was studied with 2D ^1H - ^1H COSY. The same type bridge functionality exists in the new chitosan derivative that was obtained by nucleophilic opening of (-)-caryophyllene oxide by the amine group. This derivative and of some other synthesized coumarin-chitosan derivatives have the capability to form micelles in water and the critical micellar concentration was calculated in each case.

DS of the new chitosan derivatives was determined in each case by ^1H NMR and it oscillated between 6.7 and 42.0%. The M_n y M_w of the studied derivatives, that was obtained by HPLC/SEC were higher than the starting chitosan, which indicates that the preparation occurred without degradation of the polymeric chain.

The second chapter under the “Imino and secondary amino chitosans” describes, in first place, the preparation of a variety of chitosan derivatives with fluorescent and/or antimicrobial properties under very mild conditions by reaction, in an acidified methanolic suspension, of low molecular weight chitosan **CS5** (M_w 97600 g mol $^{-1}$, DD = 87%) with aromatic aldehydes (4-*N,N*-diphenylaminobenzaldehyde, biphenyl-4-carboxaldehyde, 4-nitrobenzaldehyde, 4-hydroxybenzaldehyde, 4-*N,N*-dimethylamino-1-naphthaldehyde, 1-pyrenecarboxaldehyde). An unprecedented study on the evaluation of the degree of *N*-substitution (DS, ranging from 12.0% to 31.7%) for the chitosan Schiff bases by using solid state ^{13}C CPMAS NMR

is performed. A linear correlation between the DS obtained for the secondary amino chitosans by ^1H NMR (10.2-55.3%) and those obtained by CPMAS ^{13}C NMR (13.8-34.4%) has allowed us to calculate an empirical correlation factor that could be applied on other chitosan-based aromatic systems.

Simultaneous reactions of several aldehydes with chitosan were successfully carried out, and the obtained DS values of each unit incorporated were supported by kinetic studies.

It was also carried out, in collaboration with the Prof. Bliard of the Institut de Chimie Moléculaire de Reims" CNRS-UMR (France), the reductive amination of chitosan with a highly crystalline polymaltosidic polysaccharide, as a way to have a multivalent presentation of a polymer over the backbone of other polymer.

Some of the synthesized derivatives were fluorescent. The chitosan derivatives emit fluorescence with high intensity and stability. Their use as polarity sensor was explored for the Schiff base obtained by the reaction of chitosan with biphenyl-4-carboxaldehyde, finding that the addition of traces of non-polar solvent such as dichloromethane caused drastic changes in the wavelength and intensity of emission. This behavior as polarity fluorescent sensor, together with chirality of the polymeric backbone and the possibility of modulating the fluorescent behavior varying the nature of the starting aldehyde used, allows expecting that these new polymers have application as polyvalent sensors in biological systems.

The M_w and M_n of the chitosan secondary amines were determined by HPLC/SEC. The obtained values of molecular weight for these derivatives

with respect of the starting chitosan confirmed that the preparation conditions did not degrade the polymeric backbone.

In the third chapter, related to “*Chitosan ureidyl derivatives*”, it was prepared two types of derivatives from low molecular weight chitosan **CS4**, ureidyl derivatives by reaction of the biopolymer with isocyanates (phenyl isocyanate, 3,5-dimethylphenyl isocyanate and 4-biphenyl isocyanate) and crosslinked derivatives from chitosan and diisocyanates [4,4'-methylenebis(phenyl isocyanate), hexamethylene diisocyanate)]. Previously, to establish the optimal reaction conditions, the corresponding model reactions of 1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-amino-2-desoxy- β -D-glucopyranose hydrochloride were performed with the same isocyanates and diisocyanates.

The absence of the carbamate band at 1700 cm^{-1} in FTIR, the information provided by ^1H RMN, 2D ^1H - ^1H COSY, the reaction conditions, and the insolubility of the products in organic solvents, confirmed the absence of *O*-substitution in the reaction of chitosan and the different isocyanates. The DS of chitosan derivatives prepared in this chapter range from 5.8 to 29.2% (determined by ^1H NMR).

In the fourth chapter, “*Formation of quaternized chitosan derivatives*” it is described in first place the quaternization of low molecular weight chitosans **CS3** ($M_w = 86352\text{ g mol}^{-1}$, DD = 86%) and **CS4** with glycidyltrimethylammonium chloride (GTMAC), in neutral conditions in H_2O for chitosan **CS4** and in acidic conditions at pH = 3.7 for the chitosan **CS3**. These quaternized derivatives were soluble until pH 11 and 12 respectively.

The regioselectivity study of the nucleophilic substitution was carried out with the aid of the ^1H NMR spectra in three different deuterated solvents and the 2D ^1H - ^1H COSY of the synthesized products in the different conditions. The mainly obtained product for both types of reaction conditions was the one resulting from the attack of the nucleophile at the less substituted carbon of the oxirane ring.

Two different strategies were followed for the quaternization of some of our new chitosan *N*-substituted derivatives. The first consists of the quaternization of the already obtained *N*-substituted derivative by treatment with GTMAC; it was essayed successfully by reaction of the urea obtained from chitosan and 3,5-dimethylphenyl isocyanate. The second approach uses a starting quaternized chitosan that was described in the previous paragraph, which then undergoes the desired *N*-substitution. This second strategy was essayed in the reductive amination between quaternized chitosan **CS3** in acidic conditions and 4-hydroxybenzaldehyde, with a successful result. The solubility of the quaternized urea increased with respect of the starting urea in diluted acid medium and the quaternized secondary amine was soluble in acid medium, H_2O , and in basic solution until pH 12. The obtained DQ for the different products prepared in this chapter are in the range from 33.8 to 63.5%.

The NMR diffusion-filtered experiments allowed us to demonstrate that the Schiff base resulting from the reaction between quaternized chitosan **CS3** and 4-hydroxybenzaldehyde is not stable in D_2O .

Within chapter 5, under the title “*Applications*”, it is described, in first place, the preparation of films from the different low and medium molecular weight chitosan samples: **CS1** ($M_w = 42400 \text{ g mol}^{-1}$, DD = 87 %), **CS3** (M_w

= 86352 g mol⁻¹, DD = 86%) y **CS6** (M_w = 160253 g mol⁻¹, DD = 83%) by casting in microwaves with cycles of heating and cooling. The formation of films take place in 40 minutes, a procedure much faster than other described casting methods (48-72 hours). In addition, films of chitosan derivatives were obtained from chitosan previously prepared as it is mentioned above, and then by treatment of these films with 4-nitrobenzaldehyde, 4-hydroxibenzaldehyde or biphenyl-4-carboxaldehyde. The prepared films have been characterized by the analysis of their mechanical properties and by FTIR.

Some of the films obtained by microwave irradiation are more resistant (Young Modulus = 3360-5129 MPa and TS = 45.5-61.7 MPa) than what has been so far described in literature for chitosan and have higher rigidity (%EB = 2.3-2.8).

In a second subsection within this chapter Antimicrobial activity of some chitosan based biomaterials have been determined for three types of Gram-negative bacteria: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhimurium*, obtained from the “Colección Española de Cultivos Tipos”. The microbiological assays against these bacteria were performed in agar plates with chitosan or chitosan secondary amine derivatives in solution, films or as a solid. Chitosan **CS1** in solution had high inhibitory capacity against *S. typhimurium* and *E. coli* and the secondary amine resulting from the reaction of the biopolymer with biphenyl-4-carboxaldehyde, in solid state had antibacterial activity against all three types of analyzed bacteria, showing high values of % of inhibition in all cases (100, 98.0 y 92.5, for *S. typhimurium*, *E. coli* and *K. pneumoniae*, respectively).

In a third section of this chapter it is described a comparative study on the preparation of chitosan nanoparticles by the procedure of ionic gelation with sodium tripolyphosphate in 1% CH₃COOH and in a 0.1 M NH₄OAc /0.2 M CH₃COOH buffer. This study was done during an internship in the lab of Prof. C. Bliard. A higher amount of nanoparticles, with more homogeneous and smaller sizes for the same proportion chitosan:TPP was obtained using the 0.1 M NH₄OAc /0.2 M CH₃COOH buffer, although with lower zeta potential values than the ones prepared in 1 % CH₃COOH.

In addition, nanoparticles have been prepared from the reaction of chitosan **CS5** and 7-hydroxycoumarin-4-yl-acetic acid and crosslinked with TPP in the 0.1 M NH₄OAc /0.2 M CH₃COOH buffer. The nanoparticles of smaller size were in average 168 nm. The nanoparticle size was correlated with the fluorescence emission, the smaller the nanoparticle the lower emission. In consequence, this coumarinic derivative originates not only micelles in water, as it was described in chapter 1, but also fluorescent nanoparticles with the possibility of calculating the size of nanoparticles based on their fluorescence with a calibration curve.

Finally, the process of formation of hybrid gels has been explored, based on the reaction between siloxane nanoparticles and low molecular weight chitosans (**CS1** and **CS3**). The conditions for the formation of gels between the mentioned chitosans and GT nanoparticles have been optimized through several assays using different reagents such as nanoparticles prepared from 3-glycidyloxypropyl trimethoxysilane and tetramethoxysilane (**GT** nanoparticles), 3-aminopropyl trimethoxysilane and tetramethoxysilane (**AT** nanoparticles) and glutaraldehyde. From these studies, we concluded that the gelification process is clearly dependent on pH and temperature

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

QUITINA Y QUITOSANO

La quitina, polisacárido con estructura (1→4)-2-acetamido-2-deoxi-β-D-glucopiranososa, es el segundo biopolímero más abundante de la naturaleza y el que tiene una mayor tasa de reposición. La historia de este precursor del quitosano, empieza en 1811, año en el que Henri Braconnot la descubre, tras el tratamiento del material fungal proveniente de *Agaricus volvaceus*, *A. acris*, *A. cantarellus*, *A. piperatus*, *Hydnum repandum*, *H. hybridum* y *Boletus viscidus* con una solución de hidróxido potásico a ebullición. La liberación de amoníaco y de ácido acético a través de ensayos químicos demostró la presencia de nitrógeno y de unidades de acetilo en el compuesto que Braconnot llamó “fungina”.¹ En 1823, Antoine Odier obtuvo el mismo compuesto de la cutícula de insectos y la llamó quitina, de la palabra griega para túnica o envoltura. Posteriormente en 1859, Rouget describió la obtención de una “quitina soluble” en soluciones diluídas de ácidos orgánicos, a la que Félix Hoppe-Seiler renombró como quitosano en 1894.²

En la actualidad, aproximadamente 10^{13} kg de quitina, son sintetizados y degradados cada año en la biosfera. La abundancia de este polímero se pone de manifiesto al encontrarse en una gran variedad de invertebrados y en dos formas: como α-quitina en los cálices de hidrozooos, las cáscaras de huevo de nematodos y rotíferos, la rádula de moluscos y las cutículas de los artrópodos, y como β-quitina en las conchas de braquiópodos y moluscos, el hueso de la sepia y la pluma del calamar. La quitina se encuentra en los

¹ Muzzarelli, R. A. A.; Boudrant, J.; Meyer, D.; Manno, N.; DeMarchis, M.; Paoletti, M. G. *Carbohydrate Polymers*, **2012**, *87*, 995-1012.

² Gao, W.; Lai, J. C. K.; Leung, S. W. *Front. Physiol.* **2012**, *3*, 1-13.

exosqueletos, membranas peritróficas y en los capullos de insectos. La quitina en la pared celular fungal varía en cristalinidad, grado de unión covalente con otros componentes, especialmente glucanos, y en su grado de acetilación (DA).³ En la tabla siguiente se muestra la proporción aproximada de quitina, proteína, grasas y cenizas, en la cáscara de la gamba y en el cangrejo.

Tabla 1. Contenido aproximado en la cáscara de gamba y cangrejo.⁴

Parámetro	Cáscara de gamba (%)	Cangrejo (%)
Humedad	75-80	70
Cenizas ^a	30-35	45-50
Proteínas ^a	35-40	30-35
Quitina ^a	15-20	13-15
Grasas ^a	3-5	1.0-1.5

^aProporción basada en peso seco.

La solubilidad de la quitina es mucho menor que la de la celulosa dada la alta cristalinidad de la quitina a consecuencia de los puentes de hidrógeno que forma, principalmente a través del grupo acetamido.⁵ Esta alta cristalinidad de la quitina dificulta las modificaciones químicas y las aplicaciones de este polímero, debido a su insolubilidad en agua, ácidos y medios orgánicos. En la actualidad, por tanto, la mayor parte de las investigaciones sobre aplicaciones y modificaciones químicas en el campo de la quitina-quitosano se centran en el quitosano, cuyo grupo amino puede

³ Terbojevich, M.; Muzzarelli, R. A. Chitosan. En *Handbook of Hydrocolloids*; Phillips, G. O., Williams, P. A., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2000; pp 367–378.

⁴ Kosseva, M. R. Sources, Characterization, and Composition of Food Industry Wastes. En *Food Industry Wastes Assessment and Recuperation of Commodities*. Kosseva, M. R.; Webb, C., Eds.; Academic Press: San Diego, 2013; pp 37–60.

⁵ *Material science of chitin and chitosan*; Uragami, T., Tokura, S., Eds.; Springer: Heidelberg, 2006.

protonarse, lo que permite su solubilización en medios acuosos en presencia de ácidos tales como láctico, cítrico, acético y fórmico.⁶

A diferencia de la quitina, la presencia del quitosano como tal en fuentes naturales es limitada. Su existencia en la naturaleza no fue conocida hasta 1954 cuando fue descubierto en la levadura *Phycomyces blakesleeanus*.⁷ Posteriormente se describió el quitosano como componente estructural de las paredes celulares de ciertos hongos, especialmente de las especies de *Zygomycetes*.⁸ Por esta razón, la mayor disponibilidad del quitosano para fines comerciales proviene de la desacetilación de la quitina, obtenida principalmente de los residuos de crustáceos,⁹ por métodos químicos y/o enzimáticos.¹⁰

En el método químico la quitina es sometida a un proceso de dismineralización, desproteización y después a tratamiento en un medio alcalino concentrado, en general hidróxido de sodio acuoso al 50 %, a temperaturas de 100 °C o superiores, produciéndose la desacetilación.

La variabilidad del proceso de desacetilación química, en términos de la concentración de la base utilizada, la temperatura, y el tiempo de reacción, generan una serie de “quitosanos” con distintos grados de desacetilación (DD), longitudes de la cadena de polímero, distribución de las unidades acetiladas-desacetiladas y distintos valores de pK_a .

⁶ Romanazzi, G.; Gabler, F. M.; Margosan, D.; Mackey, B. E.; Smilanick, J. L. *Phytopathology* **2009**, *99*, 1028–1036.

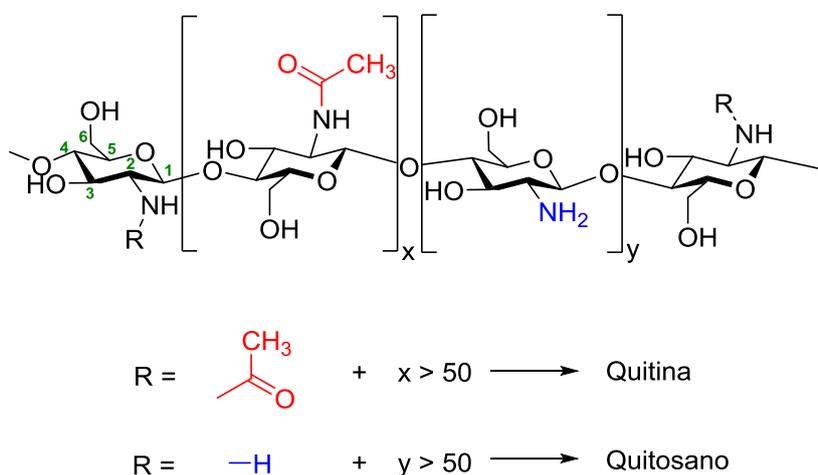
⁷ Kreger, D. R. *Biochim. Biophys. Acta* **1954**, *13*, 1–9.

⁸ Davies, L. L.; Bartnicki-Garcia, S. *Biochemistry* **1984**, *23*, 1065-1073.

⁹ Alishahi, A.; Aider, M. *Food Bioprocess. Tech.* **2012**, *5*, 817–830.

¹⁰ Pillai, C. K. S.; Paul, W.; Sharma, C. P. *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 641–678.

Al referimos al grado de desacetilación (DD), que es la relación porcentual entre la cantidad de unidades de *N*-glucosamina y la cantidad total de monómeros en el polímero, se reconoce generalmente al quitosano como un polímero con un grado de desacetilación mayor del 50 % (Esquema 1),¹¹ o un contenido de N mayor del 7 % y está definido en base a su solubilidad en medios ácidos diluidos, aunque este último parámetro es dependiente del peso molecular y del patrón de desacetilación del quitosano.¹²



Esquema 1. Estructura de Quitina y Quitosano.

En base a la longitud de la cadena de quitosano, éste puede clasificarse como oligoquitosano, o como de bajo, medio o alto peso molecular. Sin embargo, no hay un consenso que defina exactamente cada grupo. Por ejemplo, para un quitosano de peso molecular $M_w = 180000 \text{ g mol}^{-1}$ algunos

¹¹ Van den Broek, L. A. M.; Knoop, R. J. I.; Kappen, F. H. J.; Boeriu, C. G. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *116*, 237-242.

¹² Domard, A.; Domard, M. Chitosan: Structure-properties relationship and biomedical applications. En *Polymeric Biomaterials*, 2nd Edition; Dumitriu, S., Ed.; Marcel Dekker, Inc: New York, 2001, pp187-192.

autores lo definirían como de alto peso molecular,¹³ mientras que otros lo clasificarían como de peso molecular medio.¹⁴ Por otro lado, las especificaciones de Sigma-Aldrich definen el quitosano de bajo peso molecular como aquel que se ubica entre el rango amplio de pesos moleculares de 50000 a 190000 g mol⁻¹, el de medio entre 200000 a 700000 g mol⁻¹ (200-800 cP), y el de alto peso molecular el quitosano de más de 700000 g mol⁻¹.

Como en todos los polielectrolitos, la constante de disociación del quitosano no es constante, sino que depende del grado de disociación al cual es determinada: la variación del valor del pK_a del quitosano puede ser calculado usando la ecuación de Katchalsky:¹⁵

$$pK_a = pH + \log \left(\frac{1-\alpha}{\alpha} \right) = pK_o - \frac{\epsilon \Delta\psi (\alpha)}{k_T} \quad (1)$$

$\Delta\psi$ es la diferencia de potencial electrostático entre la superficie del polication y la referencia, α es el grado de disociación, k_T es la constante de Boltzman y ϵ es la carga del electrón. El valor de pK_o se puede estimar cuando $\alpha=1$ y el polímero no está cargado y por tanto el potencial electrostático se convierte en 0. En estas condiciones el valor de pK_o es alrededor de 6.5. El valor de pK_o es independiente del grado de desacetilación del quitosano, mientras que el pK_a es dependiente de este parámetro por lo que la solubilidad del quitosano es dependiente del método de desacetilación utilizado.

¹³ Agirre, M.; J Zarate, J.; Ojeda, E.; Puras, G.; Desbrieres, J.; Pedraz, J. L. *Polymers* **2014**, *6*, 1727-1755.

¹⁴ Sun, Y.; Cui, F.; Shi, K.; Wang, J.; Niu, M.; Ma, R. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2009**, *35*, 379-86.

¹⁵ Katchalsky, A. *J. Pol. Sci.* **1954**, *12*, 159-184.

Las propiedades químicas del quitosano derivan de su naturaleza de poliamina que posee grupos amino y grupos hidroxilo reactivos y capacidad de formación de quelatos con muchos iones metálicos de transición. Además, el carácter básico del quitosano hace que sea soluble en medio ácido acuoso dando especies policationicas y siendo sus características dependientes del pH.^{16,17,18,19}

En cuanto a sus propiedades biológicas, a modo de resumen, en la tabla siguiente se recogen las principales propiedades del quitosano en aplicaciones biomédicas:

Tabla 2. Principales propiedades del quitosano en aplicaciones biomédicas

Biodegradable	Forma películas
Biocompatible	Agente hidratantes
Bioadhesible	Materiales renovables
Sustancia policationica	Promotores de absorción
Antifúngico	No tóxico
Inmunoadyuvante	No alergénico
Antitrombogénico	Anticolesterolémico

Adaptado de: Rinaudo, M. *Polym. Int.* **2008**, *57*, 397-430.

El quitosano es biocompatible, no tóxico y tiene propiedades bacteriostáticas y antifúngicas, lo que hace de él un material interesante para

¹⁶ *Recent Research in Biomedical aspects of chitin and chitosan*. Tamura, H., Ed.; Research Signpost: Osaka, 2008.

¹⁷ Ravi Kumar, R., M. N. V.; Muzzarelli, R. A. A.; Shasiwa, H.; Domb, A. J. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 6017-6084.

¹⁸ *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and their Derivatives*; Se-Kwon, Kim., Ed.; Taylor & Francis Group: Boca Raton, Fl., 2011.

¹⁹ Agulló, E.; Mato, R.; Peniche, C.; Tapia, C. *Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones*. Pontificia Universidad Católica del Perú/ Fondo Editorial 2004.

aplicaciones en farmacia y medicina,^{20,21} como liberación de fármacos, de genes, manipulación e ingeniería de tejidos, cicatrización de heridas, etc. Tiene también aplicación en agricultura y en diversos sectores industriales,^{5,22} tales como alimentación, cosmética, textil, papel y tratamiento de aguas,^{23,24} e incluso en organocatálisis.²⁵ Sus propiedades fisicoquímicas y bioactivas²⁶ y su naturaleza polimérica lo hacen ideal para la formación de diversos tipos de estructuras como micelas, nanopartículas, microesferas, suspensiones, geles, films, fibras etc.,²⁷ lo cual es relevante pues las aplicaciones potenciales concretas del quitosano dependen de la formulación en que se encuentre el polímero (polvo, microesfera, nanopartícula, etc).

El quitosano es metabolizado por enzimas humanas, como la lisozima por lo que es biodegradable y se han publicado numerosas e importantes aplicaciones de este polímero en el campo de los biomateriales.^{28,29,30}

²⁰ *Polymers for Biomedical Applications*, 2^a ed.; Mahapatro, A., Ed.; ACS: New York, 2008.

²¹ Balan, V.; Verestiuc, L. *Eur. Polym. J.* **2014**, *53*, 171-188.

²² Kardas, I.; Struszczyk, M.; Kucharska, M.; Van den Broek, L. M.; van Dam, J. G.; Ciechańska, D. In *The European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE) SE -11*; Navard, P., Ed.; Springer:Vienna, 2013; pp 329-373.

²³ Farag, S.; Kareem, S. S. A. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *78*, 263-267.

²⁴ Kandile, N. G.; Mohamed, H. M.; Mohamed, M. I. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *72*, 110-116.

²⁵ (a) El Kadib, A. *ChemSusChem* **2015**, *8*, 217-244. (b) Mahe, O.; Briere, J.-F.; Dez, I. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 2559-2578.

²⁶ Rinaudo, M. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 603-632.

²⁷ *Chitosan-Based Hydrogels Functions and Applications*; Yao, K., Li, J., Yao, F., Yin, Y., Eds.; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, 2011.

²⁸ Kumirska, J.; Weinhold, M. X.; Thöming, J.; Stepnowski, P. *Polymers* **2011**, *3*, 1875-1901.

²⁹ Suginta, W.; Khunkaewla, P.; Schulte, A. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 5458-5479.

³⁰ Jiang, T.; James, R.; Kumbar, S. G.; Laurencin, C. T. Chitosan as a biomaterial: structure, properties, and applications in tissue engineering and drug delivery. En

Un análisis de la bibliografía sobre el uso del quitosano indica que se trata de un campo extraordinariamente activo, como lo indica los más de 10000 artículos científicos, incluyendo patentes habidos en el 2014 y el número de publicaciones por año. En la Figura 2 se refleja el incremento de publicaciones y, en especial, de patentes por año en los últimos 5 años.

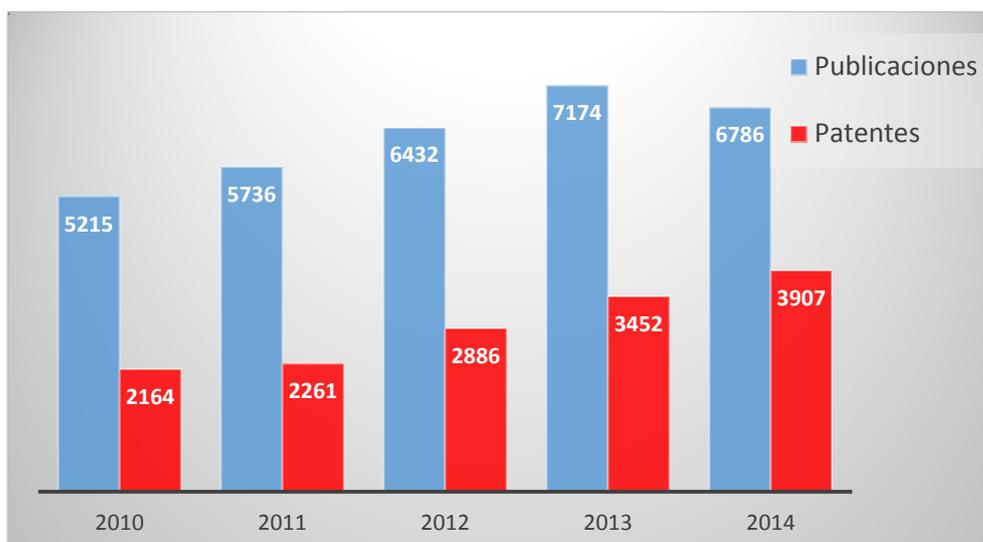


Figura 1. Publicaciones y patentes en los últimos 5 años referentes a quitosano. Fuente: SciFinder[®].

CONTEXTUALIZACIÓN Y MOTIVACIONES

El planteamiento de esta investigación surge a partir de los problemas ecológicos, económicos y medioambientales generados por el cangrejo rojo (*Procambarus clarkii*).

Al principio de la década de los setenta se introdujo en las Marismas del Guadalquivir el cangrejo de río americano (*Procambarus clarkii*, Figura 2) con objeto de repoblar la zona en la que el cangrejo autóctono, ya escaso, había contribuido positivamente, como consecuencia del removido de la tierra que producía en las plantaciones arroceras, muy extendidas y arraigadas en la zona. Este hecho causó enseguida numerosos problemas de tipo ecológico, medioambientales y económicos, que se mantienen en la actualidad. Para paliar e intentar sacar rentabilidad de la situación, se instalaron en el entorno marismeño empresas que comercializan de diversas maneras la carne del cangrejo. Sin embargo, la extraordinaria proliferación de la especie importada comenzó a generar pérdidas económicas considerables al sector arrocero de la marisma. Por otro lado, las empresas que tratan de lograr un aprovechamiento del mismo comercializando la carne del cangrejo, generan gran cantidad de residuos (exoesqueleto de cangrejo). Como parte de la solución a estos problemas nos propusimos dentro de un Proyecto más amplio en el que se enmarca la presente investigación: a) Desarrollar la química del quitosano en busca de nuevos derivados que presenten distintas propiedades fisicoquímicas y que tengan aplicación práctica en múltiples campos, lo que favorecería la implantación en la zona de procesos industriales que procuren la conversión de estos residuos en quitosano, que en sí mismo ya es un producto de alto valor añadido, y b) Estudiar las propiedades de estos nuevos materiales de gran valor tecnológico, en función del peso molecular, grado de desacetilación y sustituyentes.

Figura 2. Ejemplar de cangrejo rojo Seafood Sevilla, S.L., Isla Mayor, Sevilla.



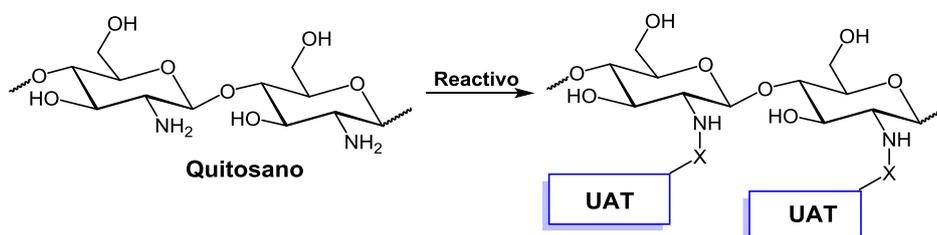
En el marco de los Proyectos de Investigación de referencia P09-AGR-4597, financiado por la Junta de Andalucía y de referencias A/023577/09 y A/030422/10, financiados por el Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación (AECID) hemos optimizado un procedimiento químico que nos ha permitido obtener quitosanos que han sido caracterizados mediante HPLC/SEC y RMN como quitosanos de bajo peso molecular: **CS1** [M_w 42400 g·mol⁻¹ (PD = 3,13), DD 87%] y **CS2** [M_w 69871 g·mol⁻¹ (PD = 2,39), DD 91%] entre otros, a partir de la quitina³¹ aislada de los desechos del exoesqueleto de cangrejo rojo suministrado por las empresas Pescacial y Seafood Sevilla, S.L. ambas con domicilio social en Isla Mayor, Sevilla.

Se trata de convertir los quitosanos de distintos PM y DD en nuevos derivados del biopolímero que posean una gama de propiedades diferentes. La modificación química del quitosano es una herramienta poderosa para controlar la interacción del polímero con fármacos, para aumentar la capacidad de carga del mismo y para diseñar el recubrimiento y el perfil de liberación de las partículas.

³¹ Su preparación ha sido optimizada a escala de planta piloto por el Dr. Francisco Carrillo de la Fuente y col. del Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad de Sevilla que forman parte de nuestro equipo de investigación.

Hay dos tipos de estrategias básicas para la modificación química del quitosano. La primera es aprovechar la mayor reactividad del hidroxilo primario de cada unidad de glucosamina para unirle restos que puedan modular su solubilidad en distintos disolventes. Por ejemplo los 6-carboximetilquitosanos, por la presencia de un grupo carboxilo, son más solubles en agua, permiten obtener polímeros de polaridad negativa de distintas propiedades a los policatiónicos y, adicionalmente, sirven como función de enganche para otros grupos de interés.

La segunda aproximación, más polivalente, es aprovechar la gran reactividad del grupo amino para unir de manera covalente a la cadena polimérica el grupo químico que modificará las propiedades fisico-químicas del polímero en el sentido buscado o, en general, la unidad activa transportada (UAT), a través de una función orgánica puente (Figura 3). Es importante considerar las características de la función orgánica que sirve de unión. Debe ser una función: a) Fácil de formar; b) Polivalente, es decir, debe permitir la unión al polisacárido y al menos a otra fracción que será la que auténticamente aporta determinadas propiedades fisico-químicas al nuevo sistema o sea la fracción activa transportada; c) Idealmente, no debería ser inerte químicamente, es decir, ya esa función, por sí misma, modularía las propiedades del polímero, por su polaridad y/o su capacidad de formación de interacciones polares; d) debe ser metabolizada de una manera predecible o poder soportar grupos que lo sean. Hemos escogido esta segunda aproximación, teniendo que cuenta la existencia de procesos de reacción específicos del grupo amino y, de otra parte, las condiciones más suaves requeridas para la reacción selectiva del grupo amino, más nucleófilo, en comparación con las requeridas por los grupos hidroxilo reactivos del biopolímero para su reacción con electrófilos en general.



UAT = Unidad Activa Transportada

	Reactivo	X
(a)		-(C=O)-R
(b)		-CH ₂ -CHOH-CH ₂ R
(c)		=CH-R
(d)	+ NaBH ₃ CN	-CH ₂ -R
(e)	R-N=C=O O=C=N-R-N=C=O	-C=O-NH-R -C=O-NH-R-NH-C=O-

Figura 3. Diferentes funcionalidades puente entre el biopolímero y la unidad activa transportada (UAT) empleadas en esta Tesis Doctoral para su unión covalente a quitosano.

Así, nos hemos propuesto como objetivos de esta Tesis, cuyo objetivo general es contribuir al desarrollo de la química del quitosano como una vía de valorización y aprovechamiento de los residuos del cangrejo rojo

Procambarus clarkii generados en las Marismas del Guadalquivir, los que se indican a continuación.

OBJETIVOS

1. Preparación de derivados fluorescentes multifuncionales de quitosano conteniendo cumarinas como cromóforos, a través de una función amida (*a*), o de una función 1,2-hidroxiamino (*b*).
2. Preparación de derivados de quitosano que incorporan una unidad de reconocida actividad farmacológica, unida covalentemente al esqueleto polimérico a través de una función 1,2-hidroxiamino (*b*).
3. Síntesis de iminas o bases de Schiff y aminas secundarias derivadas de quitosano, mediante reacción de quitosano con aldehídos (*c*) y a través de aminación reductiva de quitosano con aldehídos (*d*), respectivamente, con propiedades fluorescentes y/o antimicrobianas.
4. Preparación de ureas derivadas de quitosano por reacción de quitosano con isocianatos y derivados de quitosano entrecruzados por reacción con diisocianatos (*e*).
5. Cuaternización de quitosanos y de derivados de quitosano a través de la apertura de un oxirano cuaternizado (*b*).
6. Adicionalmente, con objeto de facilitar el diseño de los experimentos y el análisis de resultados, preparación de compuestos modelo derivados de glucosamina.

7. Estudiar diferentes aplicaciones del quitosano y derivados de quitosano como formación de films, actividad antimicrobiana y formación de nanopartículas y geles.

Los resultados obtenidos en esta investigación se exponen y analizan en la presente memoria. En el Capítulo 1 se describen las reacciones de quitosano con cumarinas para la formación de nuevos derivados anfifílicos con funcionalidad amida con aplicaciones como detectores de pH con alta emisión de fluorescencia. También se describe la reacción del quitosano con el óxido de cariofileno, compuesto con actividad antitumoral e interesante por la rigidez de su anillo. Para algunos derivados se estudia su capacidad de formación de micelas en agua.

En el Capítulo 2 se describen reacciones de formación de iminas derivadas de quitosano y preparación de aminas secundarias derivadas de quitosano con propiedades fluorescentes y /o antimicrobianas. Se determinan los pesos moleculares de algunos de estos derivados por HPLC/SEC. Se comparan los grados de sustitución (DS) obtenidos mediante ^1H RMN y ^{13}C CPMAS RMN para las aminas secundarias derivadas de quitosano. Se evalúa de forma preliminar la utilización de este tipo de compuestos como sensores químicos por fluorescencia.

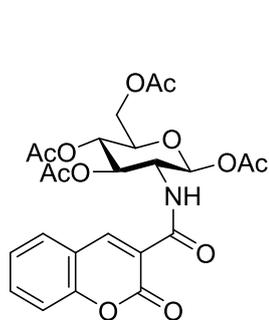
En el Capítulo 3 se describe la formación de ureas derivadas de quitosano por reacción de quitosano con isocianatos y su caracterización por FTIR, ^1H RMN y ^{13}C CPMAS RMN. Se describen también las reacciones de entrecruzamiento utilizando quitosano y diisocianatos. Se incluye también en el capítulo la descripción y análisis de las reacciones modelo realizadas utilizando glucosamina tetra-*O*-acetilada con cada uno de los isocianatos y diisocianatos empleados frente a quitosano.

La cuaternización de quitosano y derivados de quitosano se trata en el Capítulo 4, profundizando en la asignación de las señales del espectro ^1H RMN y en el estudio de la regioselectividad de la apertura nucleófila, utilizando la información de espectros ^1H RMN en distintos disolventes y del 2D ^1H - ^1H COSY.

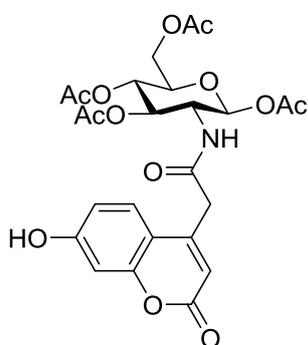
En el capítulo 5 de la presente memoria se exploran diversas aplicaciones del quitosano y sus derivados, tales como formación de films, actividad antimicrobiana, capacidad de formación de nanopartículas y formación de geles híbridas entre quitosano y siloxano. En este último caso se evalúa la dependencia del proceso de formación de gel con el pH y la temperatura.

RELACIÓN DE COMPUESTOS

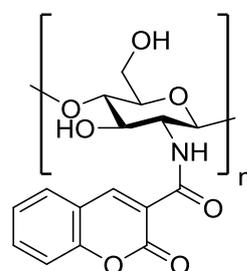
A continuación se indican los nuevos productos preparados en esta Tesis Doctoral.



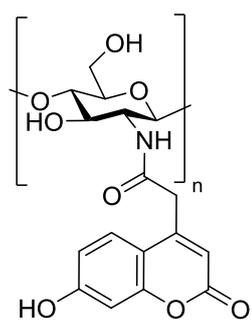
1



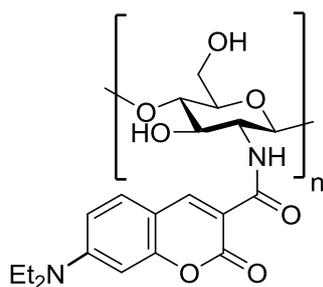
2



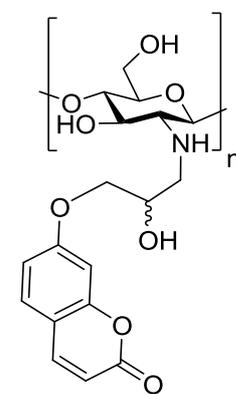
3



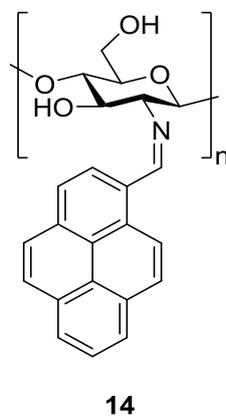
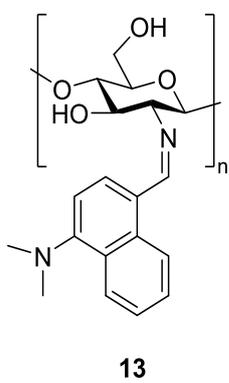
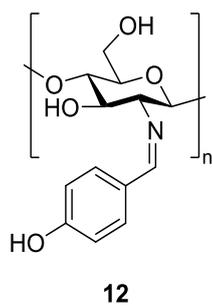
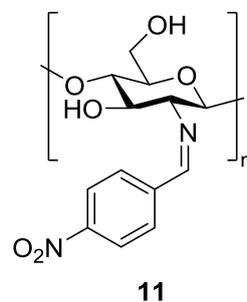
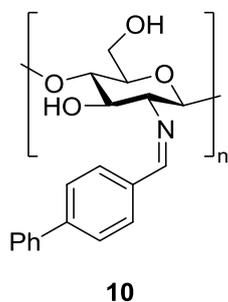
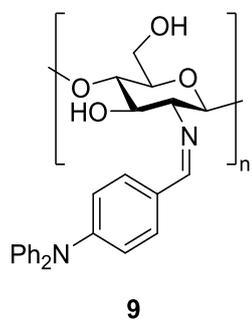
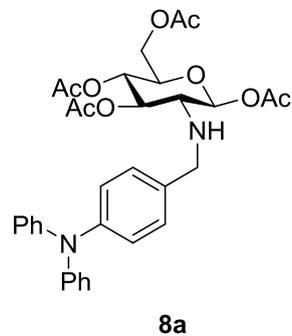
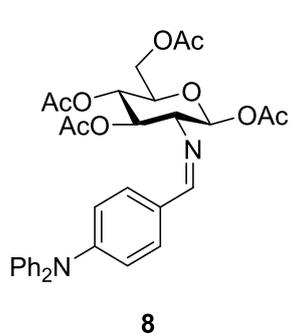
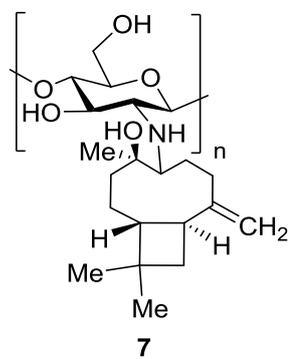
4

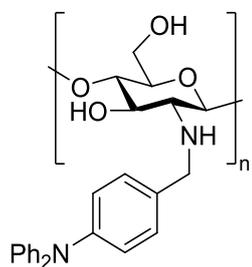


5

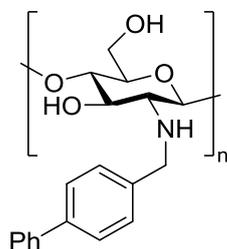


6

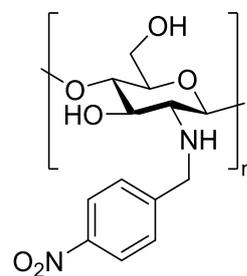




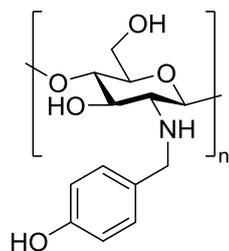
15



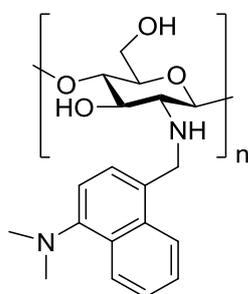
16



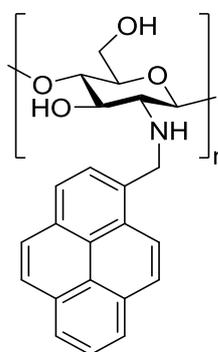
17



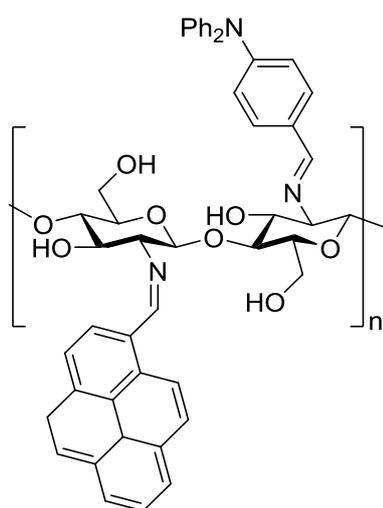
18



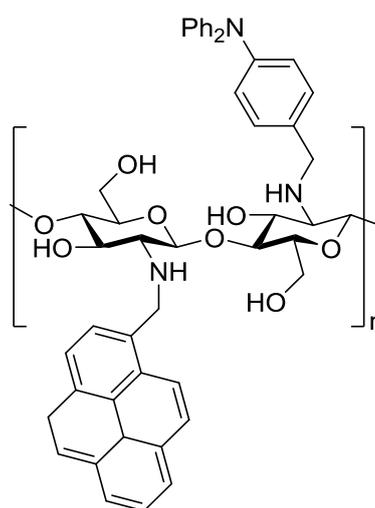
19



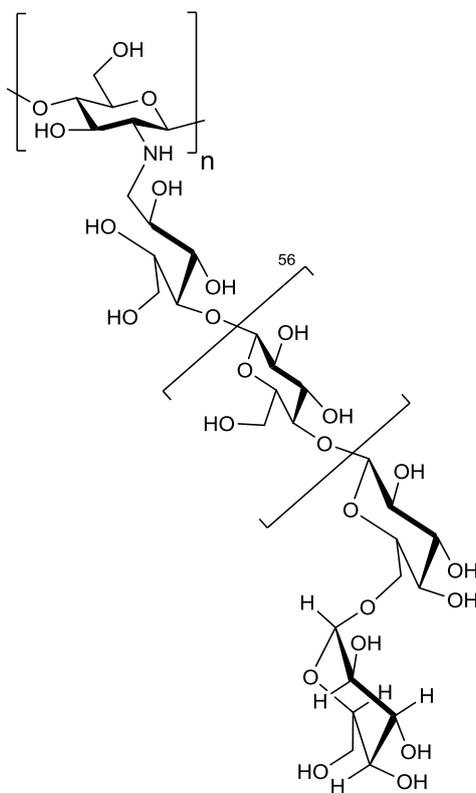
20



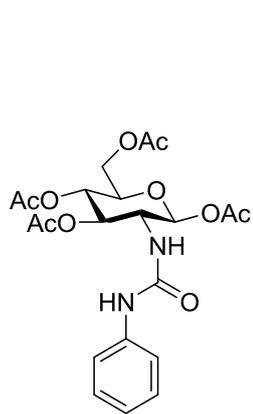
21



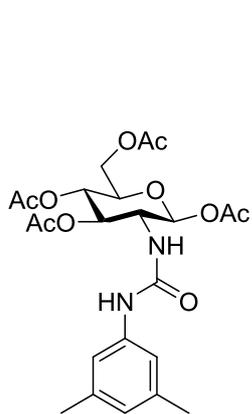
22



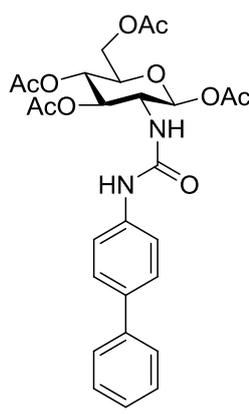
23



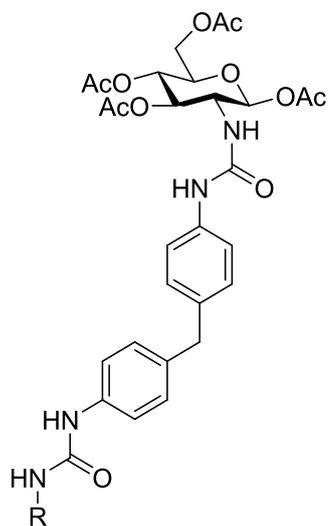
24



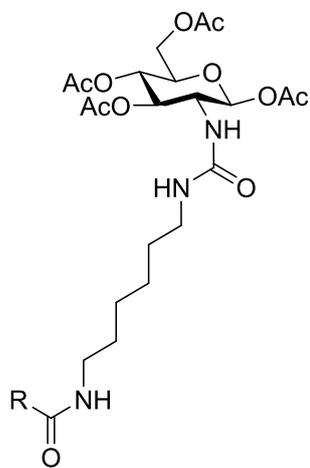
25



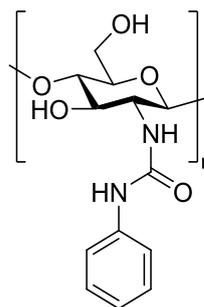
26



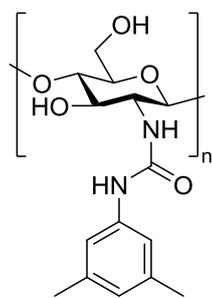
27



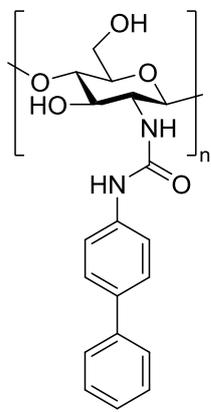
28



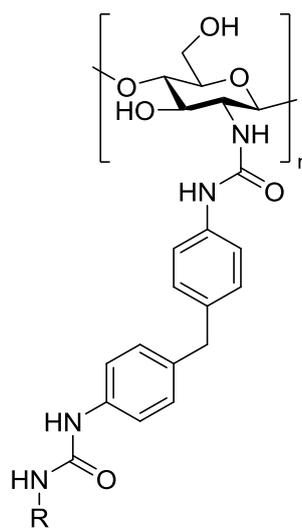
29



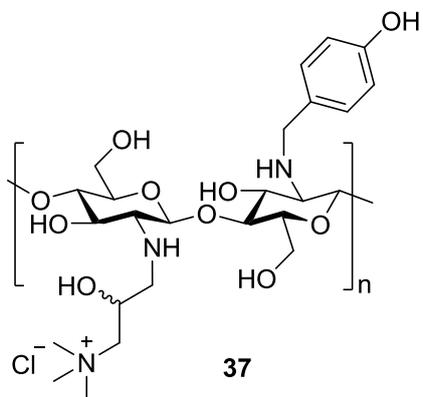
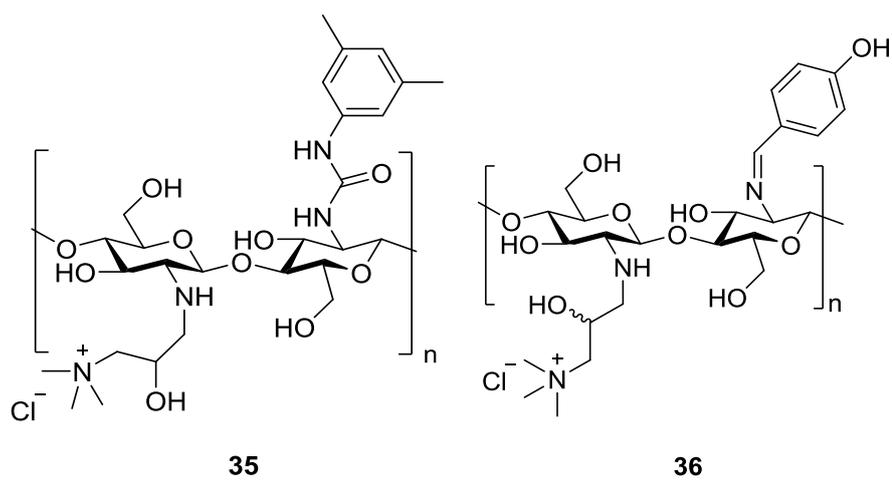
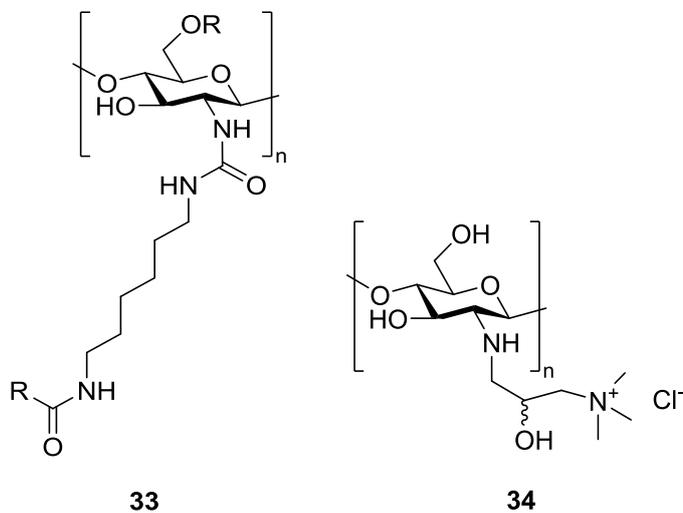
30



31



32



**CAPITULO 1 NUEVOS
DERIVADOS ANFIFÍLICOS DE
QUITOSANO CON
FUNCIONALIDAD DE AMIDA Y
DE 1,2-HIDROXILAMINA**

1.1 Antecedentes

En la actualidad, el gran interés de los compuestos fluorescentes y de los polímeros fluorescentes en particular, se debe fundamentalmente a dos hechos: sus amplias aplicaciones³² y sus altamente sensibles y específicos métodos de detección.³³ Los sensores fluorescentes o colorimétricos basados en polímeros presentan ventajas importantes, tales como facilidad de preparación, simplicidad de uso, amplificación de la señal, facilidad de fabricación de dispositivos, etc.³⁴

Se ha descrito el posible uso de polímeros fluorescentes, como resinas fotoconductoras, materiales fotosensibles, materiales electroluminiscentes y captadores de fotones.³⁵ Adicionalmente, pueden utilizarse como sondas luminiscentes para estudiar la conducta de los polímeros en disolución y para comprender el comportamiento de las macromoléculas biológicas,

³²(a) Rettig, W.; Strehmel, B.; Shrader, S.; Seifert, H. (Eds.) *Applied Fluorescence in Chemistry, Biology y Medicine*; Springer: New York, **1999**. (b) Hötzer, B.; Medintz, I. L.; Hildebrandt, N. *Small* **2012**, *8*, 2297–2326. (c) Slavik, J. *Fluorescent Probes in Celular and Molecular Biology*; CRC: Ann Arbor, **1993**. (d) Zhang, X.; Yin, J.; Yoon, J. *Chem. Rev.*; **2014**, *114*, 4918–4959. (e) Christensen, J.; L. Norgaard, R.; Bro, S.; Engelsen, B. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1979.

³³ (a) Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy* (3rd ed.) Springer, Berlin **2006**. (b) Herman, B. *Fluorescence Microscopy* 2^a ed.; Springer: New York, **1998**.

³⁴ Kim, H. N.; Guo, Z.; Zhu, W.; Yoon, J.; Tian, H. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 79-93.

³⁵ (a) Liu, Z.H.; Liu, J. F.; T. L. Chen, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 1019-1027. (b) Guan, X.L.; Liu, X.Y.; Su, Z.X.; Liu, P. *React. Funct. Polym.* **2006**, *66*, 1227-1239. (c) García-Martínez, J. M.; Laguna, O.; Areso, S.; Collar, E. *P. J. Appl. Polym. Sci.* **1998**, *70*, 689-696. (d) Carvell, M.; Ian, D. R.; Small, P. W. *Polymer* **1998**, *39*, 393-398.

como marcadores biológicos y como sensores en una gran variedad de campos (sensores de viscosidad).³⁶

Polímeros, sol-geles, materiales mesoporosos, agregados surfactantes, quantum dots, superficies de vidrio y oro, combinadas con distintas estrategias han sido usados en el diseño de materiales fluorescentes para el para el desarrollo de sensores.³⁷

La producción de nuevos materiales fluorescentes desempeña un papel importante en el desarrollo de sensores, ya que el rendimiento del sensor depende críticamente de las propiedades del material.³³ En la actualidad hay una clara tendencia a la utilización de polímeros naturales como alternativa a los materiales sintéticos. El atractivo de utilizar un esqueleto polimérico natural como el quitosano es que ello debe facilitar la compatibilidad del polímero fluorescente con los sistemas biológicos.

Tres clases de sensores pueden ser distinguidos considerando la meta o el nivel de detección: sensores químicos, biosensores y sensores quirales. Un cierto número de quimiosensores basados en polímeros para la detección óptica de iones metálicos, aniones, oxígeno, H₂O₂, y temperatura han sido desarrollados.^{38,39} La unión de una sonda fluorescente a un biopolímero, permite el uso del material polimérico como un biosensor^{40,41,42} o para la

³⁶ (a) Gao, H.; Wang, C.; Yang, W.; Fu, S. *J. Macromol. Sci. Part A: Pure Appl. Chem. A* **2004**, *41*, 357-371; (b) Tommeraas, K.; Stry, S. P.; Tian, W.; Kenne, L.; Varum, K. M. *Carbohydr. Res.* **2001**, *336*, 291-296; (c) Mi, F. L.; Shyu, S.-S.; Peng, C.-K. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 1985-2000; (d) Zhang, S. J.; Fang, Y.; Hu, D. D.; Gao, G. L. *Chin J. Chem.* **2003**, *21*, 249-252.

³⁷ Basabe-Desmonts, L.; Reinhoudt, D. N.; Crego-Calama, M. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 993-1017.

³⁸ Zhou, Y.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 52-67.

³⁹ Fegley, M. E.; Pinnock, S. S.; Malele, C. N.; Jones, W.E. *Inorg Chim Acta* **2012**, *381*, 78-84.

⁴⁰ Nie, G.; Bai, Z.; Yu, W.; Chen, J. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 834-840.

determinación de la vida media del material en el que la sonda fluorescente es incorporada. Conviene por ello, al utilizar un polímero fluorescente en sistemas biológicos, que éste sea biocompatible, como es el caso del quitosano. Éste, además, por tratarse de un polímero quiral podría ser utilizado para la diferenciación de enantiómeros (sensor quiral), de los que existen muy pocos ejemplos en la literatura.⁴³ Una ventaja adicional que aporta la unión covalente del marcador fluorescente al polímero es la reducción de la destrucción fotoquímica del fluoróforo o fenómeno conocido como “fotobleaching”.⁴⁴

Hay tres estrategias para la preparación de polímeros fluorescentes a) La polimerización de monómeros fluorescentes^{45,46} b) La unión de grupos fluorescentes al esqueleto polimérico o c) Por formación de complejos o mezclas con el polímero.^{47,48}

Se han descrito varios sistemas poliméricos fluorescentes interesantes derivados de quitosano. Entre ellos, una biomolécula fluorescente basada en un conjugado de quitosano y gelatina conteniendo genipina como sistema cromóforo y entrecruzante 5000 a 10000 veces menos citotóxico que el

⁴¹ Lee K¹, Povlich, LK.; Kim, J. *Analyst*, **2010**, *135*, 2179-2189.

⁴² Polyak, B.; Geresh, S.; Marks, R. S. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 389-396.

⁴³ Zhang, X.; Yin, J.; Yoon, J. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4918-4959.

⁴⁴ Cunha-Reis, C.; El-Haj, A. J.; Yang, X.; Yang, Y. *J. Tissue Eng. Regen. M.* **2013**, *7*, 39-50.

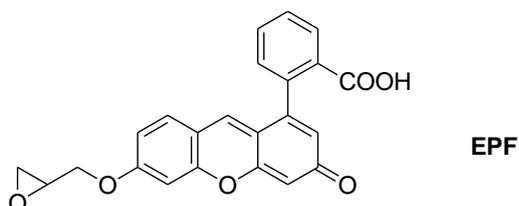
⁴⁵ Breul, A. M.; Hager, M. D.; Schubert, U. S. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5366-5407.

⁴⁶ Rodembuscha, F. S.; Leusina, F. P.; Bordignona, L. B.; Gallasb, M. R.; Stefani, V. *J. Photoch. Photobio. A* **2005**, *173*, 81-92.

⁴⁷ Cui, W.; Lu, X.; Cui, K.; Wu, J.; Wei, Y.; Lu, Q. *Langmuir* **2011**, *27*, 8384-8390.

⁴⁸ Xia, H.; He, G.; Peng, J.; Li, W.; Fang, Y. *Appl. Surf. Sci.* **2010**, *256*, 7270-7275.

glutaraldehído,⁴⁹ derivados de quitosano fluorescentes conteniendo naftalimidias, utilizando 4-bromonaphtilimida como sintón,⁵⁰ y quitosano conteniendo fluoresceína utilizable para el estudio de la interacción del quitosano con la mucina o como biomaterial potencial para sondas de temperatura y pH en sistemas biológicos.⁵¹ La preparación de este último derivado se realizó ya sea por reacción del quitosano con fluoresceína isocianato o mediante apertura del epóxido de la 3-epoxipropoxifluoresceína (EPF), preparada previamente a partir de fluoresceína y epiclorohidrina previamente, el quitosano fue *O*-cuaternizado utilizando el cloruro de glicidil tetrametilamonio como agente cuaternizante, llevándose posteriormente a cabo la reacción de acoplamiento por apertura del epóxido en DMSO a 80°C.



Muy recientemente, se ha descrito la síntesis de quitosanos conteniendo distintos fluoróforos unidos covalentemente al biopolímero través del grupo amino primario, tales como 1-cianobenzo[f]isoindol, rodamina, 9-antracilo o dansilo, entre otros.⁵²

⁴⁹ Fwu-Long, M. *Biomacromolecules*. **2005**, *6*, 975-987.

⁵⁰ Munro, N. H.; Hanton, L. R.; Robinson, B. H.; Simpson, J. *React. Funct. Polym.* **2008**, *68*, 671-678.

⁵¹ Guan, X.; Liu, X.; Su, Z. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, *104*, 3960-3966.

⁵² Gonil, P.; Sajomsang, W.; Ruktanonchai, U. R.; Na Ubol, P.; Treetong, A.; Opanasopit, P.; Puttipipatkachorn, S. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 2879-2888 y referencias contenidas.

Las cumarinas, (2*H*-cromen-2-onas) o benzo- α -pironas, constituyen una familia de compuestos, muchos de ellos naturales, que están atrayendo considerable interés debido a su reciente uso como sensores fluorescentes "off-on" para diferentes cationes⁵³ y por sus múltiples propiedades farmacológicas,⁵⁴ tales como inhibidores de las monoaminooxidasas (MAO-A y MAO-B),⁵⁵ anticoagulantes (dicumarol), antioxidantes e incluso como antitumorales,⁵⁶ y destacan también por su alta capacidad fluorescente.⁵⁷ Se usan como componentes luminiscentes de pinturas y fibras sintéticas, láser de colorante,⁵⁸ colectores de energía solar,⁵⁹ etc. Por otro lado, las cumarinas son muy sensibles a los cambios de polaridad del entorno (disolvente) y pH, modificando tanto sus máximos de absorción y de emisión como la intensidad de fluorescencia. Esto se debe a que se presentan hasta en cuatro especies distintas en función de su estado de excitación. Por ello, su unión al quitosano como vehículo, podría permitir su uso como indicador de pH y polaridad en sistemas biológicos.

⁵³ (a) Wang, L.; Li, H.; Cao, D. *Sensor Actuat. B-Chem.* **2013**, *181*, 749-55. (b) An, J.-M.; Yang, Z.-Y.; Yan, M.-H.; Li, T.-R. *J. Lumin.* **2012**, *139*, 79-83.

⁵⁴ Musa, M. A.; Cooperwood, J. S.; Khan, O. F. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2664–2679.

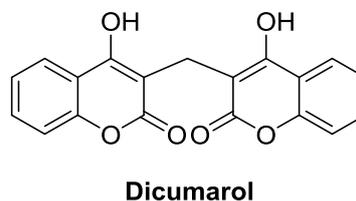
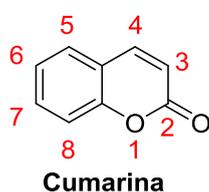
⁵⁵ Serra, S.; Ferino, G.; Matos, M. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 258-61.

⁵⁶ Jain, P. K.; Joshi, H. *J. Applied Pharm. Sci.*; **2012**, *2*, 236-240.

⁵⁷ Long, L.; Zhou, L.; Wang, L.; Meng, S.; Gong, A.; Dub, F. Zhang, C. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 8214–8220.

⁵⁸ Nadaf, Y. F.; Renuka, C. G. *Can. J. Phys.* **2015**, *93*, 3-6.

⁵⁹ Kittidachachan, P.; Danos, L.; Meyer, T. J.; Alderman, N.; Markvar, T. *Chimia Int. J. Chem.* **2007**, *61*, 780-786.



Las industrias americana y japonesa han investigado en las últimas décadas el uso de quitosano en la liberación controlada de fármacos. El quitosano no puede formar micelas en agua, pues no posee carácter anfifílico. La introducción de sustituyentes hidrofóbicos e hidrofílicos, originaría derivados de quitosano anfifílico y capaces de autoagregarse en agua formando micelas, que según la bibliografía reciente, son nanopartículas y pueden usarse como transportadores de fármacos.⁶⁰

La elección adecuada del resto lipófilo puede ayudar a vectorizar el fármaco. Por ejemplo, si la cadena lipófila tiene dobles enlaces, éstos serán oxidados con facilidad y a un coste metabólico bajo, en el hígado, ayudando así a la desorganización de la matriz o de la micela y liberar el fármaco en dicho órgano. Esta aproximación se ha ensayado con succinilquitosano y los fármacos anticancerosos Mitomicina C⁶¹ y Epirubicina,⁶² consiguiéndose la liberación sostenida y prolongada de estos fármacos.

Nosotros nos propusimos explorar este campo llevando a cabo la preparación de un derivado de quitosano conteniendo como unidad farmacológicamente activa el β -*trans*-cariofileno.

⁶⁰ Gomez d' Ayala, M.; Malinconico, P.; Laurienzo, *Molecules* **2008**, *13*, 2069.

⁶¹ Kato, Y.; Onishi, H.; Machida, Y. *Biomaterials* **2004**, *25*, 907-915.

⁶² Wang, Y.; Tu, S.; Li, R. Yang, X. Y.; Liu, L.; Zhang, Q. *Nanomed-Nanotechnol.* **2010**, *6*, 471-477.

El β -*trans*-cariofileno es un sesquiterpeno abundante en la naturaleza, obtenido principalmente del aceite de clavo (*Eugenia Carphyllata*) y de varias especies del género *Copaifera*. Tiene demostradas y variadas propiedades farmacológicas, es antianémico, antiinflamatorio, anticancerígeno, neuroprotector, etc.,⁶³ y su disponibilidad comercial (como el correspondiente epóxido), su hidrofobicidad y su estructura bicíclica inusual lo hacen sumamente atractivo.

1.2 Resultados y Discusión

1.2.1 Nuevos derivados fluorescentes glucosamina-cumarina.

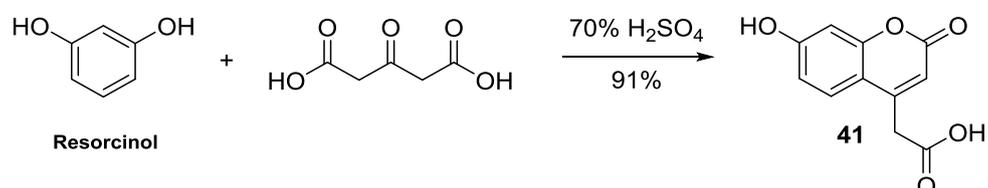
Se han preparado dos compuestos derivados de glucosamina conteniendo una unidad de cumarina como cromóforo: los compuestos **1** y **2** utilizando el ácido cumarin-3-carboxílico comercial y el ácido 7-hidroxycumarin-4-il acético (**41**),⁶⁴ respectivamente.

Preparación de unidades fluorescentes derivadas de cumarina.

La síntesis del derivado de cumarina, **41**,⁶⁴ se llevó a cabo mediante ciclación del resorcinol y el ácido 1,3-acetondicarboxílico como se muestra en el siguiente esquema.

⁶³ Molina-Jasso, D.; Álvarez-González, I.; Madrigal-Bujaidar, E. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 520-522.

⁶⁴ Zhu, Q.; Uttamchandani, M.; Li, D.; Lesaicherre, M. L.; Yao, S. Q. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1257-1260.



Esquema 2. Síntesis de ácido 7-hidroxicumarin-4-il-acético (**41**).

La reacción transcurre con buen rendimiento, dando lugar a un derivado fluorescente que se monitoriza mediante ^1H -RMN. Una ampliación de éste se muestra en la Figura 4.

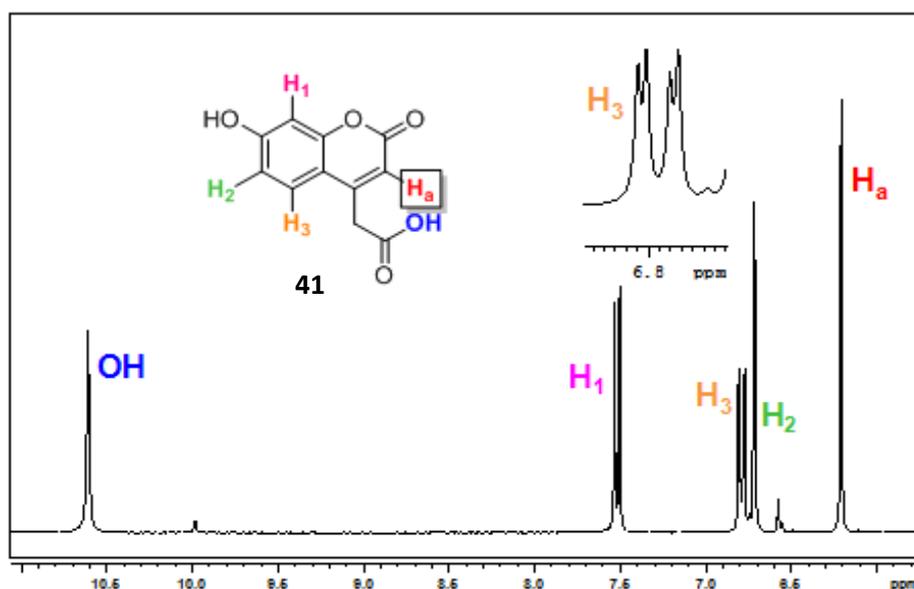


Figura 4. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, DMSO) del compuesto **41**.

La presencia del protón del ácido carboxílico a δ 10.61 ppm así como el singlete para H_a a 6.22 ppm están de acuerdo con los valores encontrados en la bibliografía. Alternativamente, se realizaron medidas de UV y fluorescencia. El objetivo de estas medidas fue determinar con precisión el

máximo de absorción y de emisión para comparar con los valores correspondientes a los derivados tanto de glucosamina como de quitosano que se describen más adelante en esta Memoria. Las medidas del compuesto **41** se llevaron a cabo utilizando como disolvente MeOH y excitando el compuesto a su máximo de absorción (Figura 5).

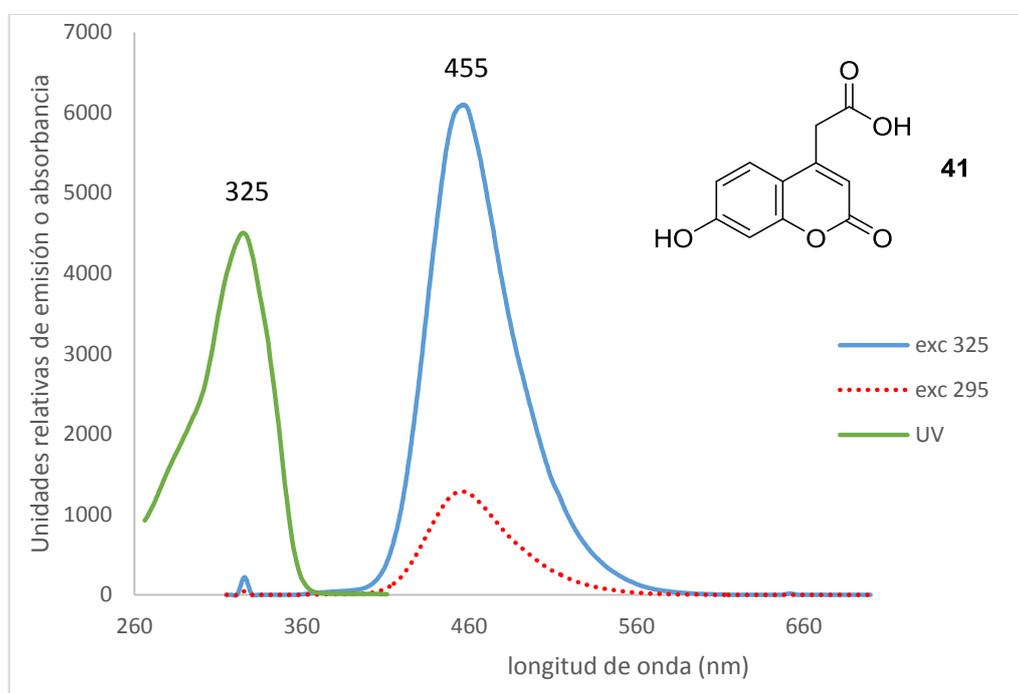
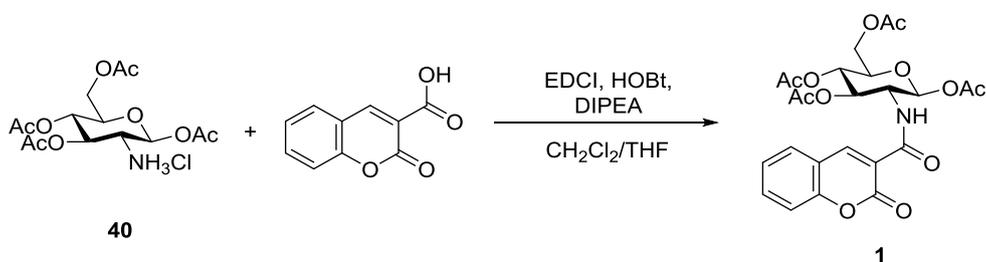


Figura 5. Espectro de absorción y fluorescencia del compuesto **41** en MeOH.

Se observa como la longitud de onda, λ , de absorción de la cumarina es de 325 nm, mientras que la emisión tiene lugar a una longitud de onda de 455 nm. Cuando se lleva a cabo la excitación a 295 nm, fuera del máximo de absorción, se obtienen las mismas señales de emisión pero con menor intensidad.

Preparación de nuevos derivados fluorescentes glucosamina cumarina

La preparación del compuesto **1**, se realizó por reacción del clorohidrato de glucosamina tetra-*O*-acetilado, **40**, con el ácido cumarin-3-carboxílico comercial, en una mezcla de CH₂Cl₂/THF utilizando EDCI como agente activante en presencia de HOBt y añadiendo DIPEA para liberar el hidrocloreuro. Se obtiene el compuesto **1** con un rendimiento del 66% tras purificación por cromatografía en columna (Esquema 3).



Esquema 3 . Síntesis del cumarin derivado de glucosamina **1**.

Este compuesto se ha caracterizado mediante RMN, IR, espectrometría de masas y fluorescencia. En la Figura 6 se muestra una ampliación del espectro de ¹H-RMN del derivado de cumarina **1**. En ella, se observan las señales más características que confirman la incorporación de la cumarina a la unidad de glucosamina. Así, el hidrógeno cumarínico H_a origina un singulete que es la señal más desapantallada. El protón amídico, H_N aparece como un doblete de constante $J = 9.6$ Hz a 8.76 ppm y el protón anomérico, H₁, como un doblete a 6.11 ppm ($J = 8.7$ Hz). También se observan en el espectro (no mostrado en la Figura 6) cuatro singuletes entre 2.03 y 1.89 ppm para 3H, cada uno correspondientes a los cuatro grupos OAc de la molécula.

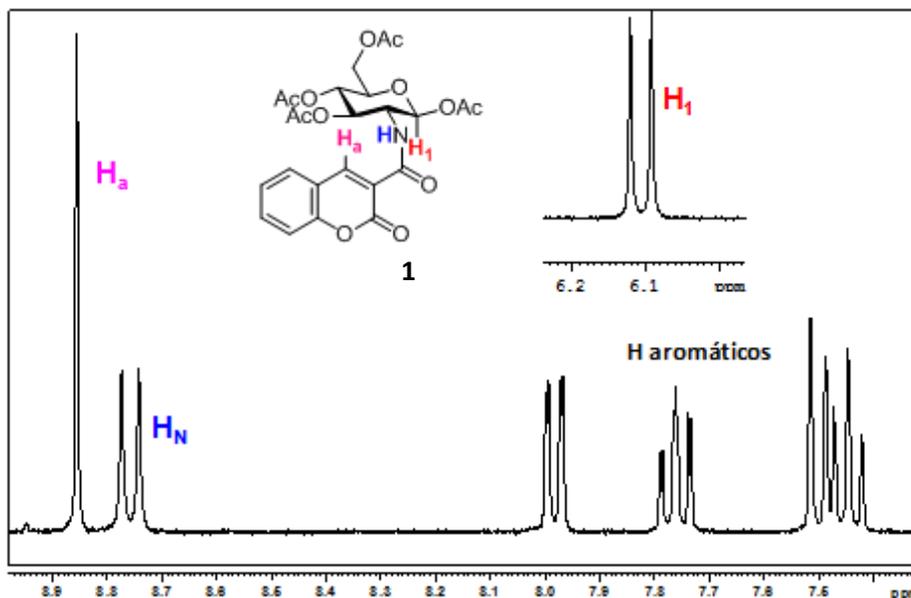
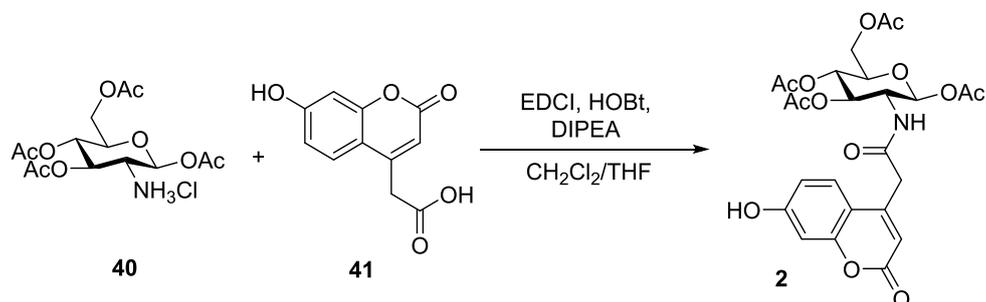


Figura 6. Espectro ¹H-RMN (300 MHz, DMSO) del compuesto **1**.

El compuesto **1** tiene un λ_{max} de absorción de 292 nm en MeOH, y una emisión de fluorescencia de 417 nm.

La síntesis del compuesto **2**, se llevó a cabo a partir de **40** y **41** utilizando las mismas condiciones experimentales que en el caso del compuesto **1**, usando EDCI y HOBt como agentes acoplantes y DIPEA como base (Esquema 4).



Esquema 4. Síntesis del derivado fluorescente **2**.

El producto deseado se obtiene con rendimiento del 68% tras purificación por cromatografía en columna y se ha confirmado su estructura, **2**, mediante RMN, IR y espectrometría de masas. En la Figura 7, pueden observarse las señales más significativas del espectro de ^1H -RMN de este derivado.

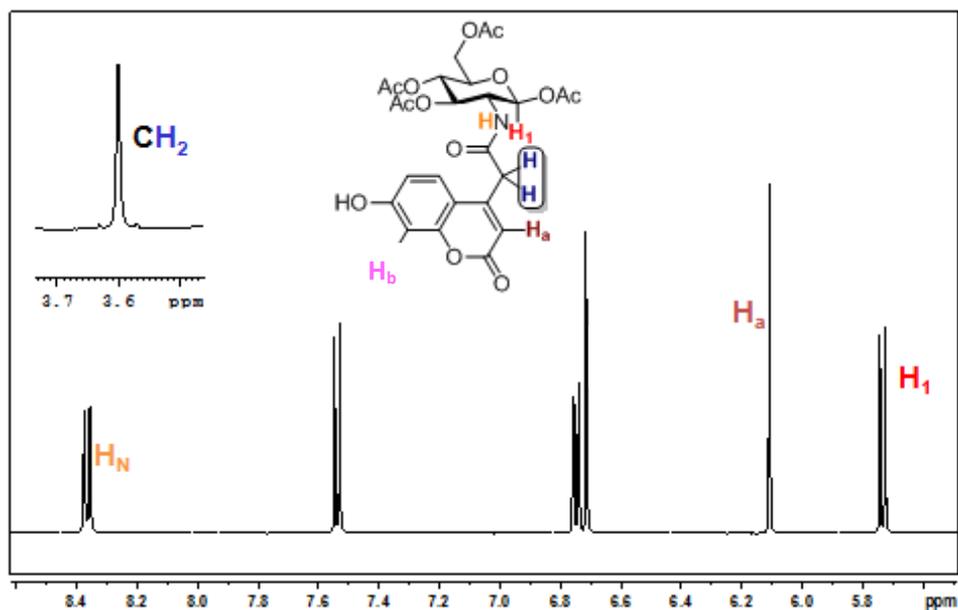


Figura 7. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, DMSO) del compuesto **2**.

El doblete a 5.73 ppm se asigna al H_1 del carbono anomérico de la forma β con una constante de acoplamiento $J_{1,2}$ de 8.5 Hz. (Figura 7). Por otra parte, se observa un singulete a 6.11 ppm correspondiente al protón olefínico de la cumarina, H_a y un doblete a 8.36 ppm con una constante de acoplamiento $J_{1,2}$ de 9 Hz que corresponde al protón de la amida. El espectro muestra también un singulete para 2H a 3.60 ppm que se asigna al grupo metileno en posición contigua al carbonilo de la amida y cuatro singuletes entre 1.99 y 1.78 ppm (no mostrado) para 3H cada uno correspondientes a los cuatro grupos OAc de la molécula.

El espectro de ^{13}C RMN está de acuerdo con la estructura propuesta.

El análisis de fluorescencia del 2-[(7-hidroxicumarin-4-il)]acetamido-1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (**2**) se muestra en la Figura 8.

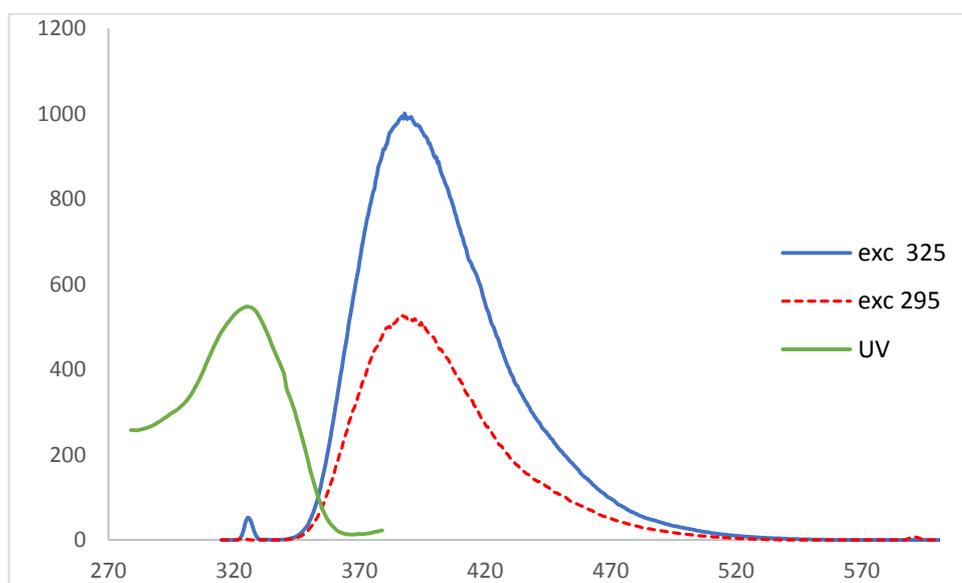
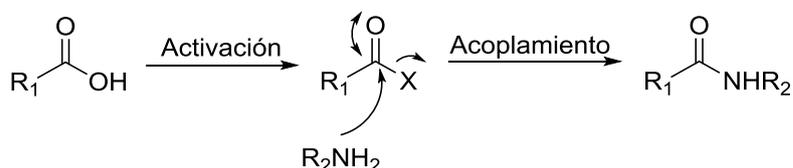


Figura 8. Espectro de UV y emisión de fluorescencia del compuesto **2** en MeOH.

Se observa cómo la longitud de onda de absorción del compuesto en MeOH es de 325 nm, y la λ de emisión 389 nm. Cuando se lleva a cabo la excitación a 295 nm, fuera del máximo de absorción, se obtienen las mismas señales de emisión con la pérdida de intensidad esperada. Esta λ de emisión es menor que en la cumarina **41**, lo que podría atribuirse a la presencia de grupos OAc que incrementan la hidrofobicidad de la unidad fluorescente.

Como hemos indicado, en la síntesis de los compuestos **1** y **2**, junto con EDCI y HOBt, se utiliza la *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) como base no nucleofílica para liberar el clorhidrato de glucosamina. En general, cuando

los ácidos carboxílicos reaccionan con aminas primarias a temperatura ambiente dan lugar a sales, productos de control cinético. La transformación de estas sales en amidas, productos de control termodinámico, mediante deshidratación requiere de altas temperaturas. Estas condiciones no son muy adecuadas cuando en la molécula se encuentran presentes algunos grupos funcionales que pueden verse afectados. Con el fin de unir el grupo amino al componente carboxílico, dicho ácido carboxílico debe ser activado por la presencia de un buen grupo saliente (Esquema 5).

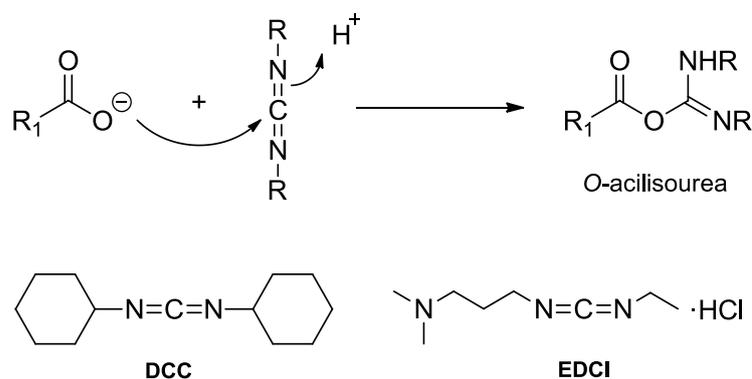


Esquema 5. Mecanismo de formación de amidas.

La activación puede llevarse a cabo de varias formas. La primera de ellas consiste en la conversión del ácido carboxílico en su correspondiente haluro de ácido, que tiene como inconveniente las condiciones de reacción necesarias, que son, bastante enérgicas pudiendo afectar a diferentes grupos funcionales presentes en los sustratos. Otra manera, es la formación de anhídridos. En el caso de anhídridos simétricos se evita la racemización pero, sin embargo, sólo se incorpora la mitad del anhídrido al producto lo que supone una pérdida de sustrato considerable, por otra parte, anhídridos mixtos presentan como inconveniente la mezcla de productos, al presentar dos centros electrófilos distintos.⁶⁵

⁶⁵ Jones, J. *Amino Acid and Peptide Synthesis*; Oxford University Press, 2002.

Se han desarrollado nuevos agentes acoplantes capaces de activar el ácido carboxílico e inducir el acoplamiento con la amina.⁶⁶ Así, son muy empleadas carbodiimidas como la dicitclohexilcarbodiimida (DCC) o la 1-(3-dimetilelpropil)-3-etilcarbodiimida (EDCI) para activar los derivados carboxilados como anhídridos o ésteres simétricos (Esquema 6).

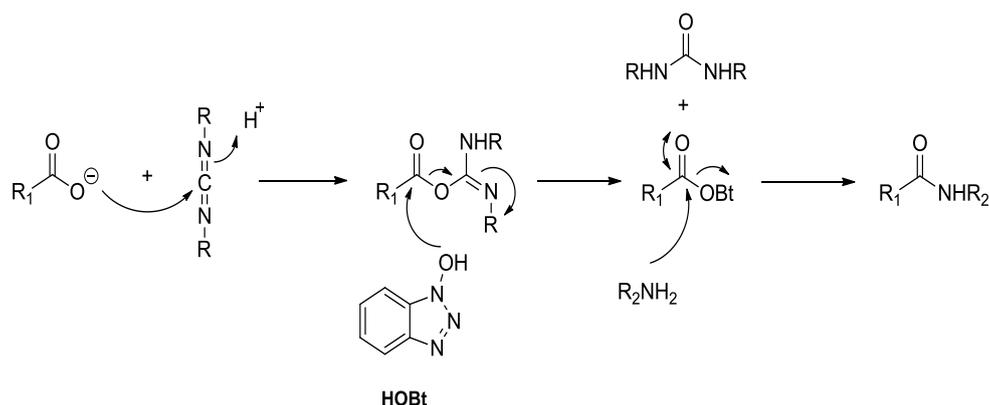


Esquema 6. Mecanismo de activación mediante agentes acoplantes.

La *O*-acilisourea se forma rápidamente, dando lugar a la urea que puede eliminarse fácilmente lavando la mezcla de reacción. Sin embargo, los intermedios de reacción son muy reactivos y pueden darse reacciones paralelas, así como la racemización. La solución a estos problemas consiste en llevar a cabo la reacción de acoplamiento en presencia de un α -nucleófilo adecuado que pueda reaccionar rápidamente con la *O*-acilisourea antes de que se puedan producir reacciones laterales. Lo ideal es que este nucleófilo se puede eliminar fácilmente, por esta razón el 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) es el reactivo más empleado como α -nucleófilo, que genera un éster activo *in situ*. La combinación de una carbodiimida, como EDCI o DCC,

⁶⁶ Han, S.; Kim, Y. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.

con HOBt es generalmente el método más empleado en la actualidad⁶⁷ para el acoplamiento de ácidos carboxílicos y grupos amino con altos rendimientos y prácticamente sin racemización (Esquema 7).



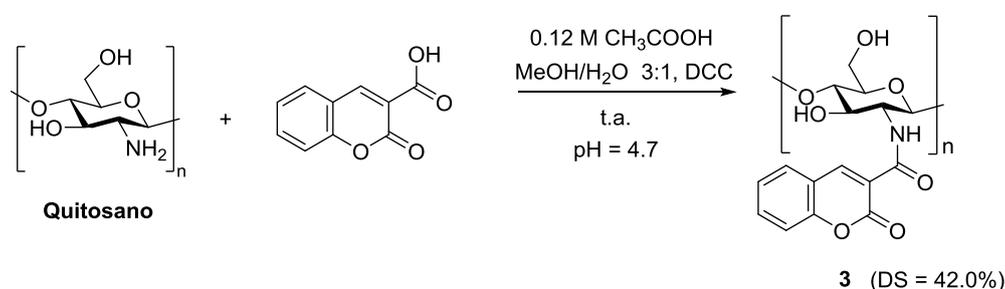
Esquema 7. Acoplamiento mediante una carbodiimida y HOBt.

1.2.2 Preparación de nuevos sistemas fluorescentes quitosano-cumarina mediante reacciones de amidación.

Para llevar a cabo reacciones del quitosano, se necesita disponer de un sistema que lo solubilice ya que es insoluble en la mayoría de disolventes orgánicos. Una de las opciones es utilizar una solución de 0.12M CH₃COOH y luego ajustar el pH de la solución al deseado con una solución de NaOH (1-4 M), considerando que el pKa del quitosano se encuentra en torno a 6.2, que corresponde a su transición soluble-insoluble.

⁶⁷ Vera-Ayoso, Y.; Borrachero, P.; Cabrera-Escribano, F.; Gómez-Guillén, M.; Caner, J.; Farrás, J. *Synlett* **2010**, 2, 271-275.

La reacción del quitosano **CS4** ($M_w = 87875 \text{ g mol}^{-1}$, DD = 86%) con el ácido 3-cumarinil carboxílico se realizó en MeOH/H₂O 3:1, a un pH de 4.7 y a temperatura ambiente, como se describe en el Esquema 8. La activación con DCC de la cumarina disuelta en MeOH se realizó separadamente antes de su adición al quitosano. Se obtuvo así el 2-[(cumarin-3-il)carboxamido]quitosano (**3**) con un rendimiento del 80% y $M_w = 100245 \text{ g mol}^{-1}$ (HPLC/SEC).



Esquema 8. Síntesis de la amida derivada de quitosano **3**.

Su estructura se confirmó mediante ¹H RMN. En dicho espectro (Figura 9), a 8.94 ppm se encuentra el H-4' de la cumarina. A 7.88 ppm se solapan los protones H-5' y H-7', y a 7.54 ppm los protones H-6' y H-8'. Los protones del quitosano se encuentran entre 5.00 y 3.00 ppm. A 4.97 ppm se encuentran el H-1_{GlcN} y H-1_{GlcNH-CO-Ar}, a 4.68 ppm el H-1_{GlcNH-CO-Ar}. Entre 4.50 y 3.40 ppm aparece la región del H-3 al H-6, el H-2_{GlcNAc}, y H-2_{GlcNAc}. A 3.28 ppm se encuentra el H-2_{GlcN}.

En base a la asignación se determinó el grado de sustitución (DS) de la reacción, tomando en cuenta la integral de los aromáticos de la unidad 3-cumarino, los 7 protones del quitosano de la región entre 5.00 a 3.00 y utilizando la ecuación (2), obteniéndose un DS = 42.0%.

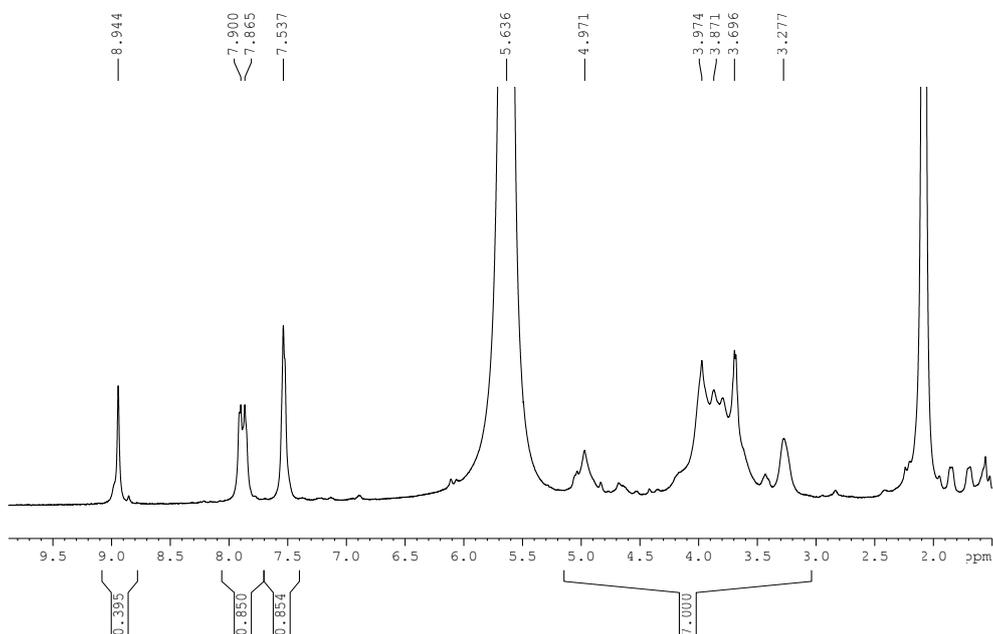


Figura 9. Espectro ^1H RMN del compuesto 3 (500 MHz, $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$ 1:1).

$$\text{DS (mol\%)} = \left[\frac{7 I_{\text{H}_{\text{Ar}}}}{5 I_{(\text{H}1-\text{H}6)}} \right] \times 100 \quad (2)$$

Tomando como referencia el quitosano de partida **CS4**, las señales más relevantes de su espectro IR que confirman la formación de la amida derivada de quitosano **4** (Figura 10) son: 1) disminución de la intensidad de la señal asociada a la flexión de N-H amina primaria (1588 cm^{-1}) como consecuencia del cambio parcial de la amina primaria del quitosano a amina secundaria (a); 2) presencia de la señal a 1678 cm^{-1} debida a la tensión C=O del enlace amida formado (b); 3) las señales a 1608 , 1565 , y a 817 , 782 , 764 cm^{-1} que pueden asignarse a la tensión de los dobles enlaces C-C y flexión

fuera del plano de los enlaces C-H del anillo aromático, respectivamente, del anillo de benceno de la cumarina **8** (c).

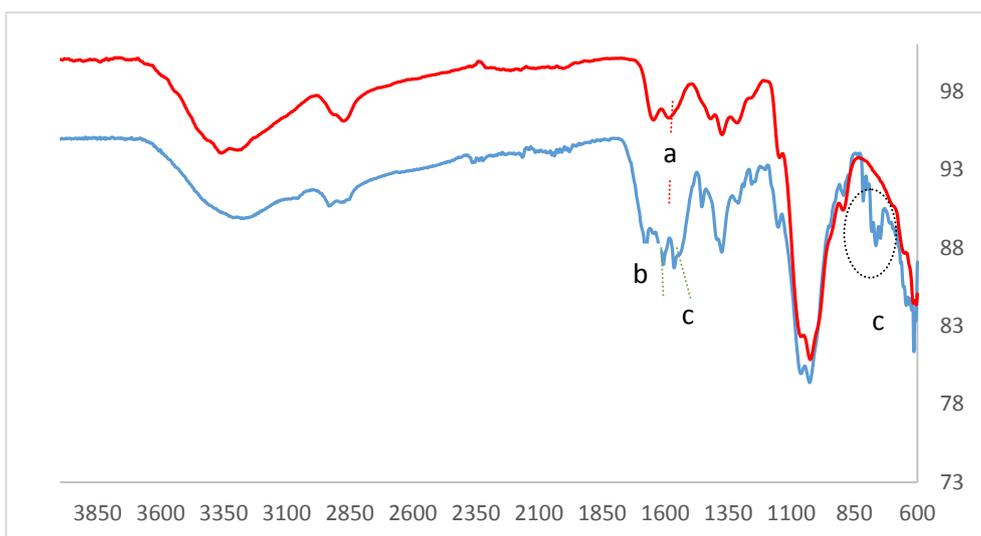
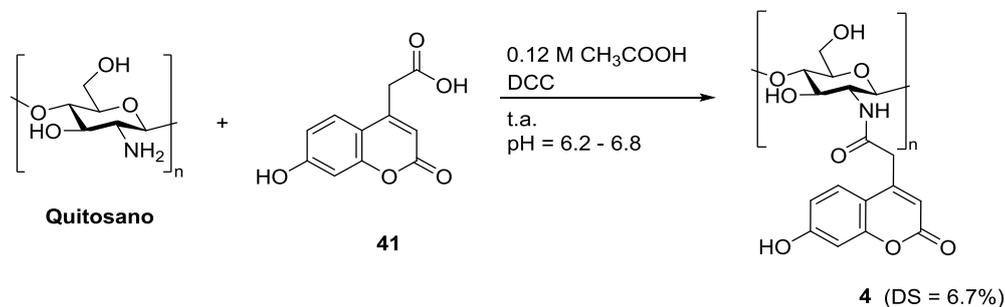


Figura 10. Espectro FTIR de la cumarina derivada de quitosano **3**, quitosano **CS4** (rojo), compuesto **3** (azul).

El λ de emisión del compuesto **3** es de 468 nm, excitándolo a su λ_{\max} de absorción de 292 en 0.17% CH_3COOH .

Se ha preparado también el sistema quitosano-cumarina **4** (Esquema 9) por reacción de quitosano **CS5** ($M_w = 97605 \text{ g mol}^{-1}$, DD = 87%) con el ácido 7-hidroxicumarin-4-il acético, **41**, preparado previamente como se ha descrito más arriba.



Esquema 9. Síntesis de la amida derivada de quitosano **4**.

Para ello, a una disolución de quitosano **CS5** en AcOH 0.12M se le ajustó el pH entre 6.2 y 6.8 con NaOH. Se le añadió el derivado de cumarina **41** y DCC. Se mantuvo la reacción durante 72 horas a se observan como señales más relevantes. y tras comprobar por c.c.f que la reacción no evolucionaba más se dio por terminada. El grado de incorporación de la cumarina al polímero (DS) fue del 6.7% y un rendimiento de 69%. Este DS se determinó a partir del espectro de ^1H RMN del compuesto **4** (Figura 11) y la ecuación (3), correlacionando el valor de la integral para la señal correspondiente a los H aromáticos del sistema cumarínico ($I_{\text{H}_{\text{Ar}}}$) con la integral de la región entre 3.00 y 4.40 ppm donde aparecen los protones H2-H6 del quitosano.

$$\text{DS (mol\%)} = \left[\frac{3 I_{\text{H}_{\text{Ar}}}}{2 I_{(\text{H}2-\text{H}6)}} \right] \times 100 \quad (3)$$

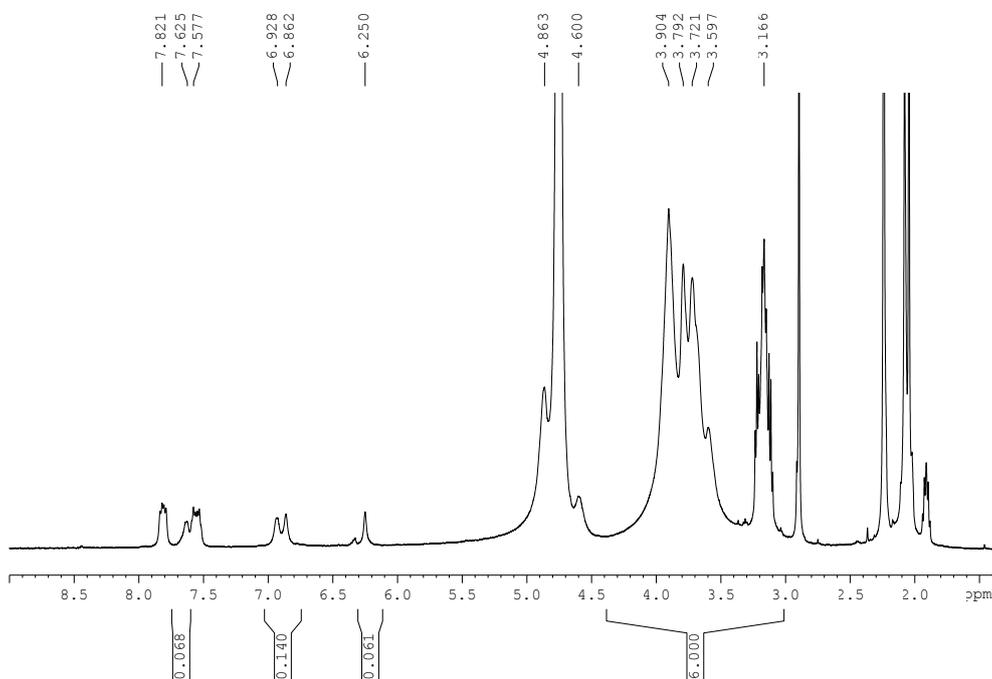


Figura 11. Espectro ^1H -RMN ($\text{CD}_3\text{COOD}/\text{H}_2\text{O}$) del derivado de quitosano **4**

En cuanto a su fluorescencia, este compuesto presenta el máximo de emisión a 459 nm, y muestra una alta intensidad (Figura 12), si se la compara con la del cromóforo correspondiente, el derivado de cumarina **41** (Figura 5), y teniendo en cuenta la baja incorporación del mismo al esqueleto del biopolímero (DS = 6.7 %).

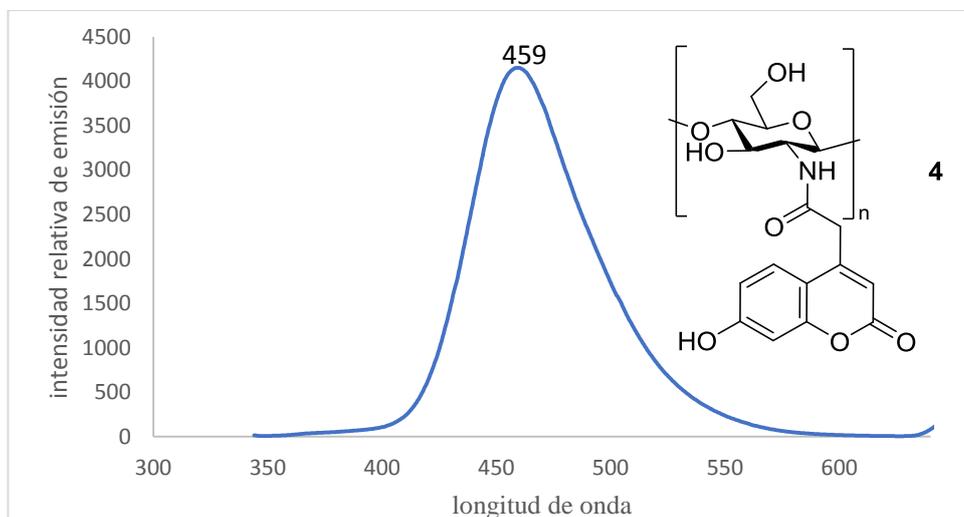
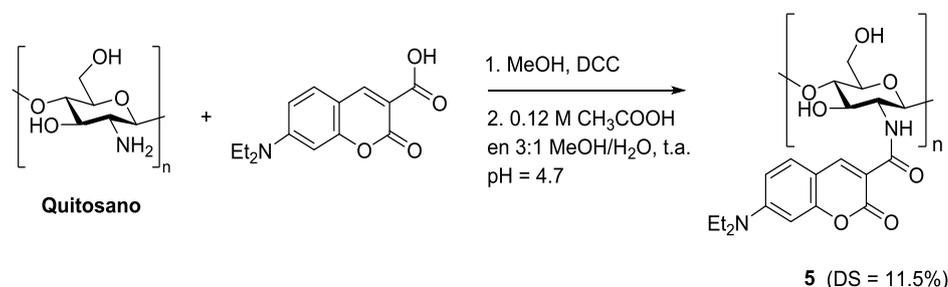


Figura 12. Espectro de fluorescencia del compuesto **4** en 0.16% CH_3COOH .

La reacción del quitosano **CS4** con el ácido 6-dietilcumarin-3-il carboxílico en la formación del compuesto **5** (Esquema 10) se realizó en condiciones similares a las utilizadas para la formación del derivado de quitosano **3**. El quitosano se solubilizó en 0.12 M CH_3COOH , mientras que en otra solución metanólica se activó la cumarina (0.61 eq-mol) con DCC con la subsiguiente adición de la solución activada al quitosano para realizarse la reacción en 3:1 MeOH/ H_2O a pH 4.70, t.a y con un tiempo de 72 horas. Se obtiene así el 2-[(7-dietilaminocumarin-3-il)carboxamido]quitosano (**5**) con un rendimiento del 74% y $M_w = 103006 \text{ g mol}^{-1}$ (HPLC/SEC).



Esquema 10. Síntesis de la amida derivada de quitosano **4**.

Tomando como referencia el quitosano de partida **CS4**, las señales más relevantes de su espectro IR que confirman la formación de la amida derivada de quitosano **5** son: 1) disminución de la intensidad de la señal asociada a la flexión de N-H amina primaria (1588 cm^{-1}) y la aparición de una nueva señal a 1553 cm^{-1} como consecuencia del cambio parcial de la amina primaria del quitosano a amina secundaria 2) presencia de la señal a 1701 y a 1625 cm^{-1} por la tensión C=O y la vibración C-O en el anillo de la pirona, respectivamente⁶⁸ 3) las señales a 1518 , y a 817 que pueden asignarse a la tensión de los dobles enlaces C-C y flexión fuera del plano de los enlaces C-H del anillo aromático, respectivamente, del anillo de benceno de la cumarina 4) incremento en la señal a 1375 cm^{-1} , por la contribución de CH₃ adicionales del auxocromo N(CH₂CH₃)₂.

En el espectro de ¹H RMN (Figura 13) se observan las señales que confirman la estructura del compuesto **5**. De 8.69 ppm a 6.67 ppm se encuentran las señales de la unidad aromática de la cumarina (H-4', H-5', H-6' y H-8'). A 4.97 ppm se encuentra el H-1_{GlcN}, a 4.67 ppm (H-1_{GlcNAc}, H-1_{GlcNHCOAr}), de 4.40 a 3.40 ppm se encuentran tanto protones del quitosano (H-2_{GlcNAc}, H-3, H-4, H-5, H-6_{a,b}, H-2_{GlcNHCOAr}) como la parte alifática del sustituyente cumarínico N(CH₂CH₃)₂. A 3.27 ppm se encuentra el H-2_{GlcN} y a 1.27 ppm los metilos de la cumarina N(CH₂CH₃)₂. El DS del producto **5** se determinó utilizando el promedio de los valores obtenidos de las ecuaciones (4) y (5), obteniéndose un valor de 11.5%.

$$\text{DS (mol\%)} = \left[\frac{I_{\text{HAr}}}{4 I_{\text{H1}}} \right] \times 100 \quad (4)$$

⁶⁸ Perelson, M. E.; Sheinker, Y. N. *J. Appl. Spectrosc.* **1966**, *5*, 78-82.

$$DS \text{ (mol\%)} = \left[\frac{I_{N(CH_2CH_3)_2}}{6 I_{H1}} \right] \times 100 \quad (5)$$

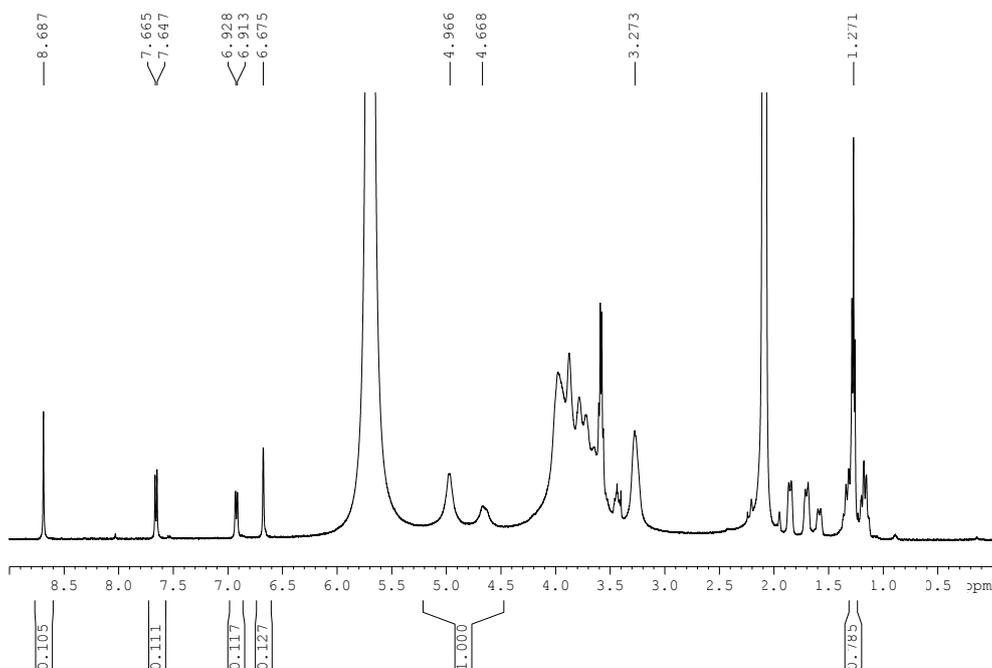


Figura 13. Espectro de la reacción del quitosano con el compuesto **42**. (50 % CD_3COOD).

El espectro UV del ácido 7-dietilaminocumarin-3-il-carboxílico (**42**) es sensible al pH como se observa en una serie de espectros de este compuesto en H_2O a la que se adicionan soluciones de NaOH o HCl para ajustar el pH (Figura 14). A pH básico la banda de absorción aparece a 407 nm. A pHs ácidos, de 5.7 a 3.5, se observa un desplazamiento batocrómico de la absorción hacia una longitud de onda de 434 nm, máximo que se mantiene a pH más bajos que 3.5.

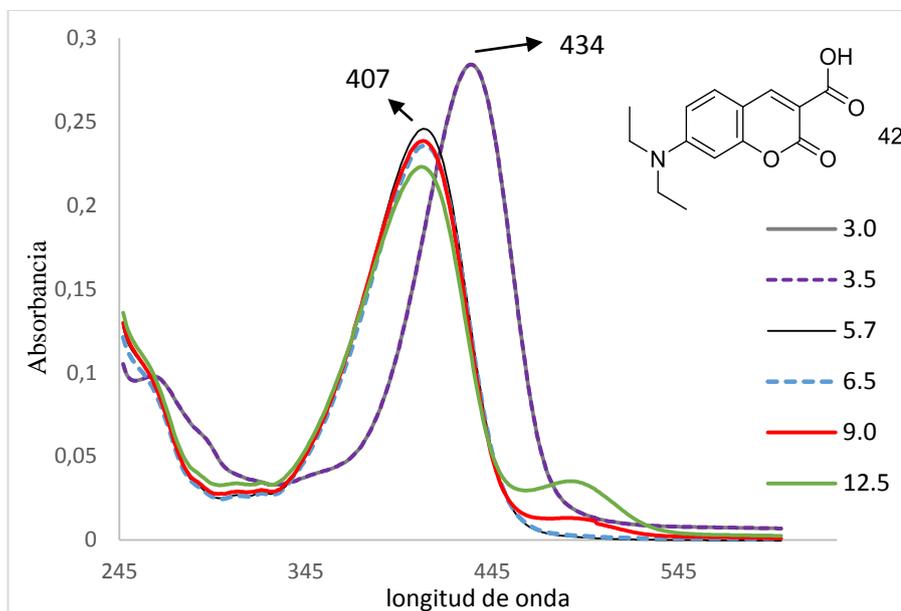


Figura 14. Espectro UV del ácido 7-dietilaminocumarin-3-il-carboxílico en solución acuosa (**42**).

El derivado cumarínico de quitosano **5** presenta una sensibilidad mucho mayor que el ácido 6-dietilcumarin-3-il carboxílico de partida a los cambios de pH. Como se observa en la Figura 15, a medida que el pH baja de 6.3 a 1.0, el λ_{max} del compuesto se desplaza batocrómicamente de manera gradual.

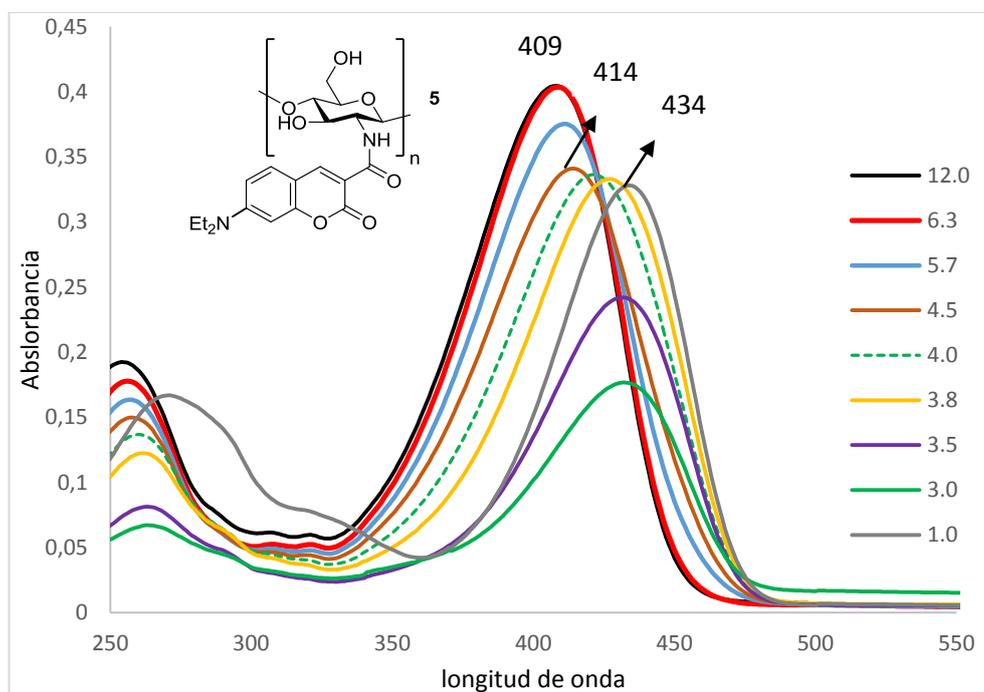


Figura 15. Espectro UV de la cumarina derivada de quitosano **5** en solución acuosa.

Debido a las interesantes propiedades UV del 2-[(7-Dietilaminocumarin-3-il)carboxamido]quitosano (**5**), se estudió la dependencia de su emisión de fluorescencia con el pH, excitando este compuesto a 432 nm en un rango de pH de 1 a 12; se obtienen los espectros mostrados en la Figura 16. La disminución observada en la intensidad de emisión a medida que aumenta el mayor pH de la solución se explica en parte por el efecto hipsocrómico del espectro UV de este compuesto al aumentar el pH de la solución y por tanto la frecuencia de excitación está más lejos del λ_{max} que para el compuesto en medio ácido.

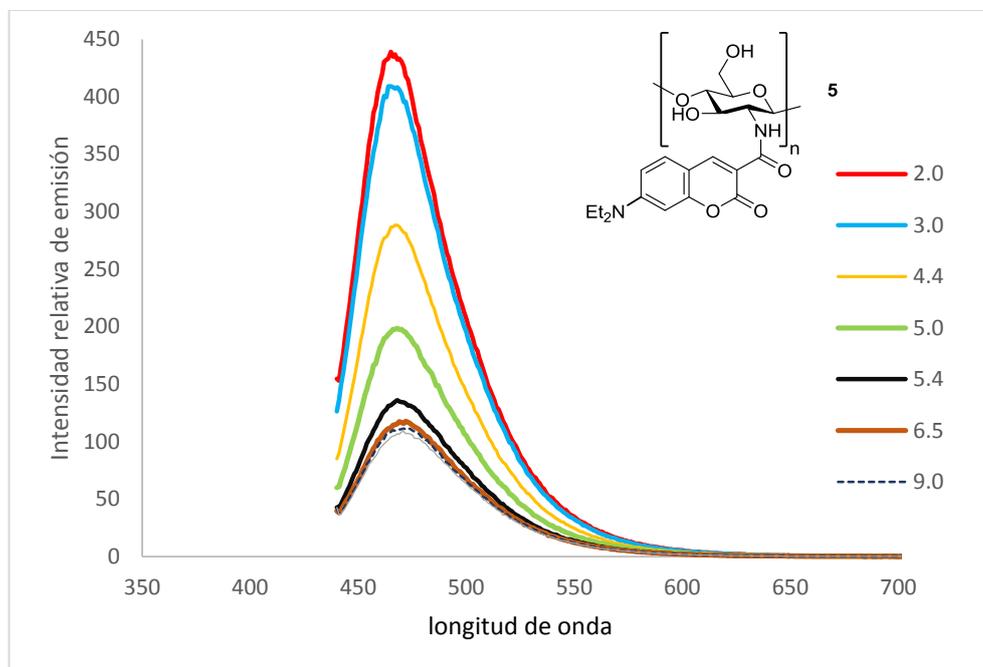
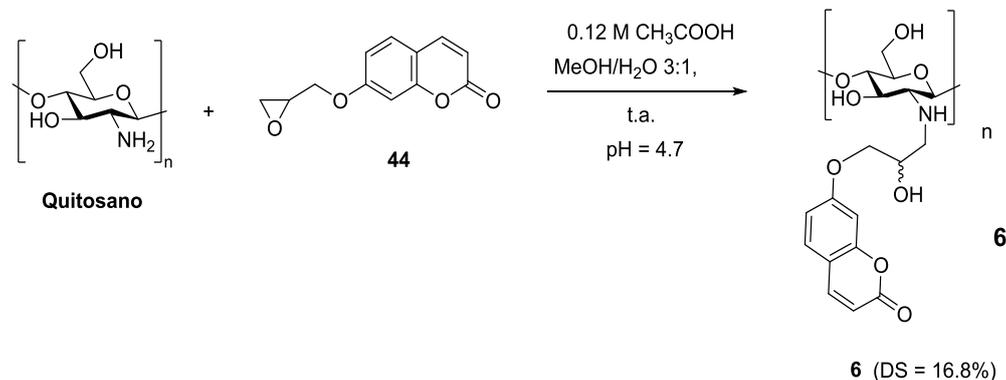


Figura 16. Espectro de emisión en función del pH de la cumarina derivada de quitosano **5** excitada a 432 nm en solución acuosa.

1.2.3 Preparación de nuevas 1,2-hidroxilaminas derivadas de quitosano mediante reacciones de apertura de epóxidos.

La reacción de formación del (1→4)-2-[3-(7-cumarinoxi)-2-hidroxipropanamino]-2-desoxi-β-D-glucano (**6**) a partir de quitosano **CS4** y 7-(2,3-epoxipropoxi)cumarina (**44**) se describe en el Esquema 11. Se disolvió el quitosano en una solución 0.12 M de CH₃COOH en agua y luego se trató con una cantidad equimolecular de 7-(2,3-epoxipropoxi)cumarina (**44**) previamente disuelto en MeOH. La mezcla se calentó a 67 °C durante 72 h después de ajustar el pH hasta 4.70 con NaOH 1M. Tras la elaboración de la reacción se obtuvo la hidroxilamina derivada de quitosano **6** con el

60% de rendimiento y un DS del 16.8% determinado por ^1H RMN, según se indica más abajo



Esquema 11. Reacción de formación del (1→4)-2-[3-(7-cumarinoxi)-2-hidroxiopropanamino]-2-desoxi-β-D-glucano (**6**).

El compuesto **6**, disuelto en 0.16% DCl, presenta/posee un máximo de absorción a 322 nm y un máximo de emisión a 388 nm similar al que presenta la umbeliferona en MeOH (389 nm). La adición de ácido o base no tiene influencia en el λ_{max} de ambas cumarinas.

En la Figura 17 se muestra el espectro ^1H RMN a 500 MHz del compuesto **6** donde aparecen entre 8.03 y 6.42 ppm cuatro señales (la penúltima para dos hidrógenos) correspondientes a los protones de la cumarina [H-4', H-5', H-6'/ H-8' y H-3', en orden decreciente de δ]. De 5.20 a 3.10 ppm se observan las señales del quitosano: 5.18 y 4.98 y 4.67 ppm (H-1_{GlcNR}, H-1_{GlcN} y H-1_{GlcNAc}), y en la región entre 4.3 y 3.0 ppm el resto de señales de éste (H-3; H-4, H-5, H-6_{a,b}, H-2_{GlcNAc}, H-2_{GlcNR}) y los protones de la parte alifática del sustituyente cumarínico (CHOH-CH₂, CH₂-OAr y -CH₂-NH) y a 3.29 ppm H-2_{GlcN}.

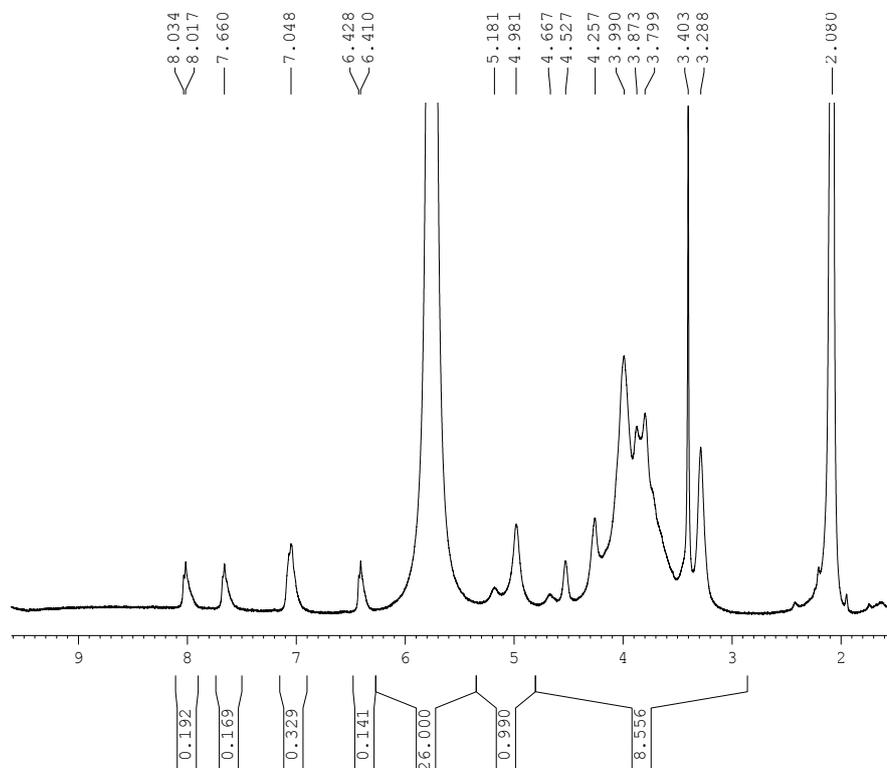
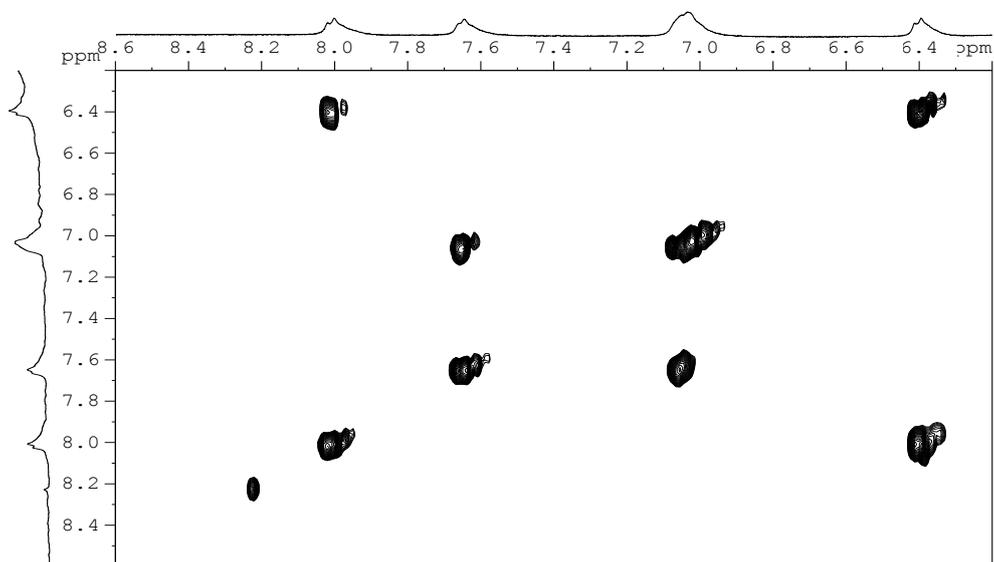
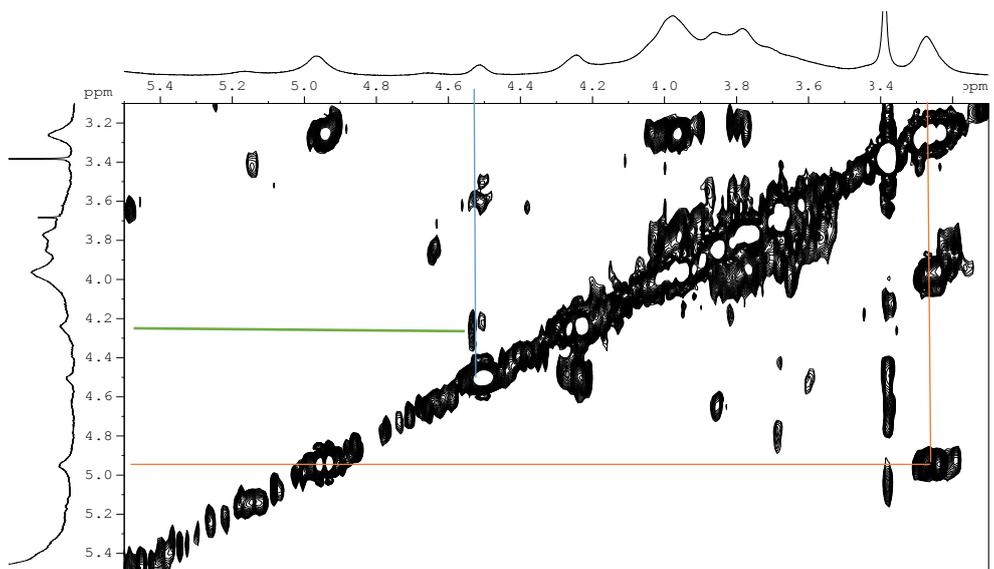


Figura 17. Espectro ^1H RMN (500 MHz, 1% CD_3COOD en D_2O) del compuesto **6**.

Para poder asignar las señales a 4.53 y 4.26 ppm, establecer las correlaciones entre los protones aromáticos y los protones del quitosano, y determinar el criterio para el cálculo del DS de la reacción se realizó un espectro ^1H - ^1H COSY (Figura 18).



(A)



(B)

Figura 18. Espectro ¹H-¹H COSY de la 1,2-hidroxilamina derivada de quitosano **6**.

La correlación observada entre los protones aromáticos [Figura 18(A)] es la esperada para la estructura propuesta **6**. La señal a 8.03 ppm (H-4') se correlaciona con la señal a 6.42 ppm (H-3'), la señal a 7.66 ppm (H-5') se correlaciona con la región a 7.05 ppm en donde se solapan H-6' y H-8'.

En la región entre 5.2 y 3.2 ppm [Figura 18(B)] se observan varias correlaciones. Así, la señal a 4.98 ppm (H-1) se correlaciona con la señal a 3.29 ppm (H-2), que a su vez se correlaciona con el H-3 (3.97 ppm).

La señal a 4.53 ppm se correlaciona con 4.26 y con la región entre 3.50-3.65. Por desplazamiento la señal a 4.53 se puede asignar razonablemente al protón metínico resultante de la apertura del epóxido por ataque del grupo amino del quitosano al carbono menos sustituido del anillo de oxirano (CHOH-CH_2) y, por tanto, la señal a 4.26 corresponde al $\text{CH}_2\text{-OAr}$ y la señal entre 3.50-3.65 ppm correspondería al metileno unido directamente al nitrógeno del quitosano (CH_2NH). Si se consideran los desplazamientos químicos teóricos estimados para los protones metínicos y metilénicos de los dos regioisómeros resultantes de la apertura nucleofílica del anillo de oxirano contenido en la 7-(2,3-epoxipropoxi)cumarina por el grupo amino en el modelo relacionado con el quitosano representado en la Figura 19, podemos concluir que el compuesto obtenido contiene, siendo probablemente mayoritario por razones de tipo estérico, el producto que se forma por ataque nucleofílico del nitrógeno del quitosano al carbono menos sustituido del anillo de oxirano (estructura **6**, Figura 19a). Es relevante indicar que en el regioisómero de éste, resultante del ataque nucleofílico al carbono más sustituido (Figura 19b), tanto la señal del metino unido en este caso al grupo NH, como los dos metilenos de la cadena alifática aparecerían en la región entre 4.00 y 3.00 ppm solapados con los H3-H6 del quitosano y,

por tanto, difícilmente observables. La configuración absoluta en el nuevo centro estereogénico no ha sido determinada.

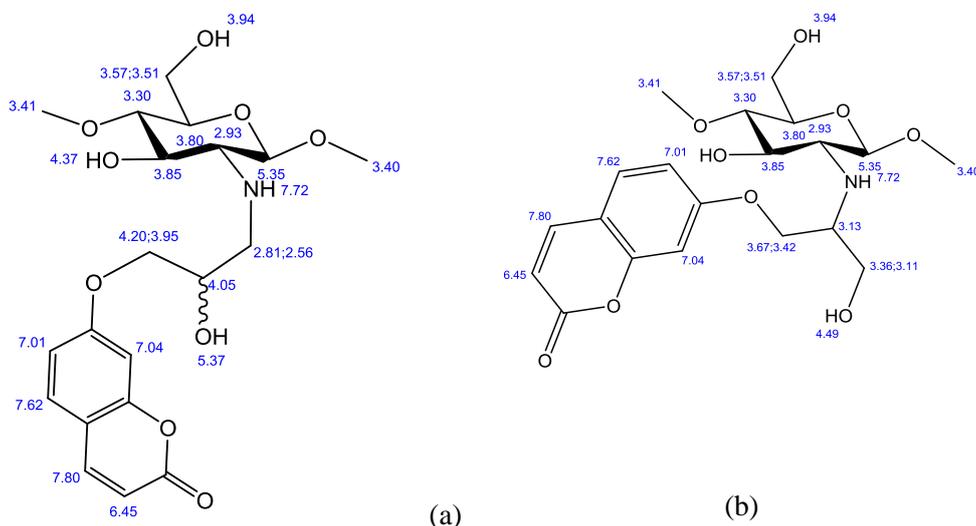


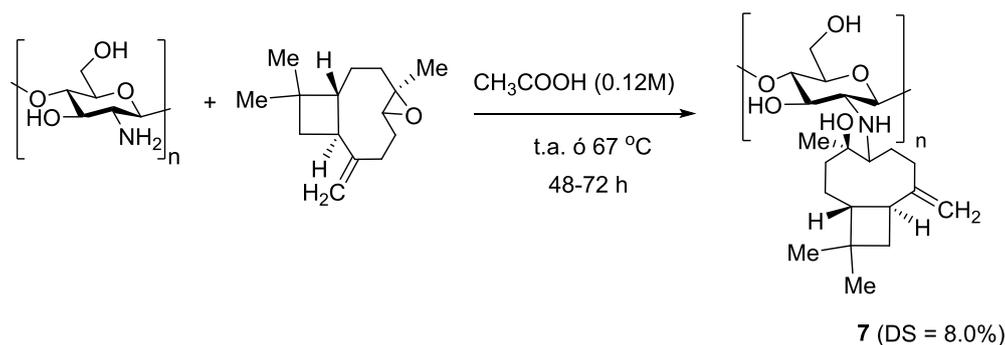
Figura 19. Desplazamientos químicos estimados (ppm) en ^1H RMN para los dos regioisómeros resultantes de la apertura nucleofílica del anillo de oxirano contenido en la 7-(2,3-epoxipropoxi)cumarina en el modelo relacionado con el quitosano.

Para el cálculo del grado de incorporación o sustitución (DS) se empleó la ecuación (6), obteniéndose un valor de 16.8%.

$$\text{DS (mol\%)} = \left[\frac{I_{\text{Ar/n}}}{5 I_{\text{H1}}} \right] \times 100 \quad (6)$$

La reacción del quitosano con el óxido de β -cariofileno comercial mediante apertura del epóxido de éste por el grupo amino de las unidades monoméricas del quitosano originó el *N*-(4-hidroxicariofilen-8-il)-quitosano (7) (Esquema12). Para ello, después de optimizar las condiciones de reacción (Tabla 3), una disolución de quitosano **CS5** en CH_3COOH 0.12 M se trató con óxido de β -cariofileno después de ajustar el pH a 6.2 por adición

de NaOH 1M y se realizó a temperatura ambiente durante 72 h. Tras la elaboración de la reacción se obtuvo la 1,2-hidroxilamina derivada de quitosano **7** con un grado de incorporación o sustitución (DS) del 8.0 % determinado por ^1H RMN.



Esquema12. Síntesis de la 1,2-hidroxilamina derivada de quitosano **7**.

Tabla 3. Condiciones de reacción ensayadas para la síntesis del compuesto **7**.

Ens.	AcOH (mL)	Otro Disolvente	MeOH/H ₂ O	CS/Cariof .	Temp. (°C)	DS (%)
A	-	DMF 5 mL	-	1/1	80	-
B	-	DMSO 5mL	-	1/0.66	86	-
C	0.69	-	4/1	1/1	t.a.	< 5
D	0.69	-	2/1	1/1	t.a.	<5
E	0.69	-	4/1	1/0.66	67	8

En el espectro ^1H RMN del compuesto **7** se observan como señales más relevantes, aparte de las correspondientes a los hidrógenos del quitosano, las de los metilos en posiciones 12' y 13' que aparecen a 0.99 y 1.01 ppm, la

del grupo metilo en posición 14' a 1.28 ppm. La determinación del DS se realizó utilizando la ecuación (7) que correlaciona el valor de la integral de los protones de los dos grupos metilo geminales del cariofileno [$\text{CH}_{3\text{gem}}$ (12' y 13')] con la integral de la región entre 2.91 y 4.34 ppm, donde aparecen los protones del quitosano H2-H6.

$$\text{DS (mol\%)} = \left[\frac{I_{\text{CH}_{3\text{gem}}}}{I_{\text{H2-H6}}} \right] \times 100 \quad (7)$$

Este nuevo derivado de quitosano **7**, es de interés farmacológico potencial debido a la acción demostrada como antianémico, antiinflamatorio, anticanceroso, neuroprotector, entre otras, del sesquiterpeno β -cariofileno del que deriva.

El cromatograma obtenido mediante HPLC/SEC del producto obtenido en el ensayo E que se reproduce en la Figura 20 en comparación con el del quitosano **CS5** de partida utilizado, muestra claramente que el proceso lleva a un producto prácticamente homogéneo ($t_R = 19.770$ min), de mayor masa que el quitosano comercial, sin degradación relevante de la cadena polimérica.

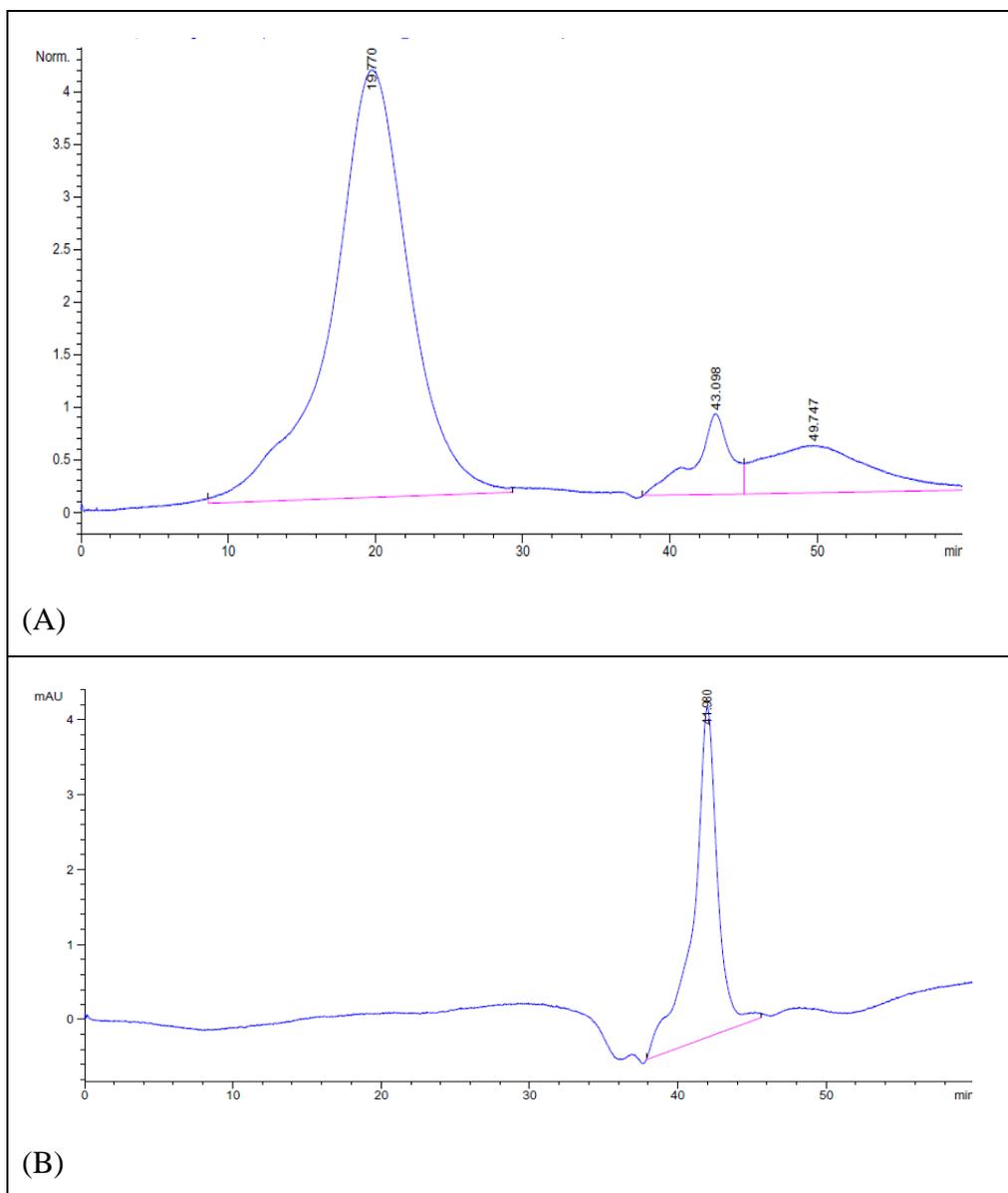
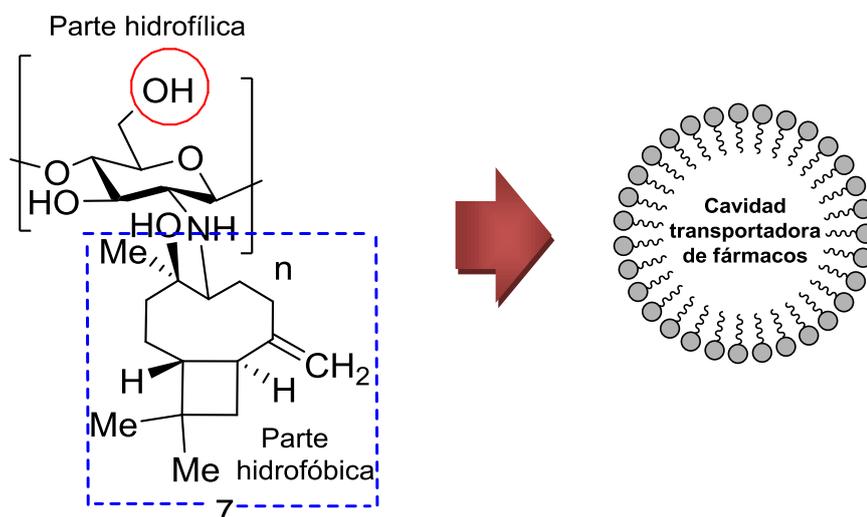


Figura 20. Cromatograma de HPLC/SEC: (A) del producto **7** obtenido en el ensayo E, (**Tabla 3**); (B) del quitosano **CS5** de partida utilizado.

El derivado **7**, podría presentar actividad como sistema de liberación controlada de fármacos, al contener en su estructura una parte hidrofílica

(OH) y una cadena hidrofóbica (cariofileno) que permite la formación de micelas en agua (Figura 21). De hecho, se ha demostrado esta capacidad, que no presenta el quitosano de partida **CS5**, determinado a partir de medidas de tensión superficial a distintas concentraciones, su concentración micelar crítica (CMC), 0.80 mg/mL, en base a la representación mostrada en la Figura 22 (A).

Figura 21. Formación de micelas en disolución acuosa de derivados anfifílicos, como el compuesto **7**.



De manera análoga, se ha determinado la capacidad para la formación de micelas en agua del sistema fluorescente quitosano-cumarina **4** descrito anteriormente, siendo 0.82 mg/mL su concentración micelar crítica, en base a la representación que se muestra en la Figura 22(B).

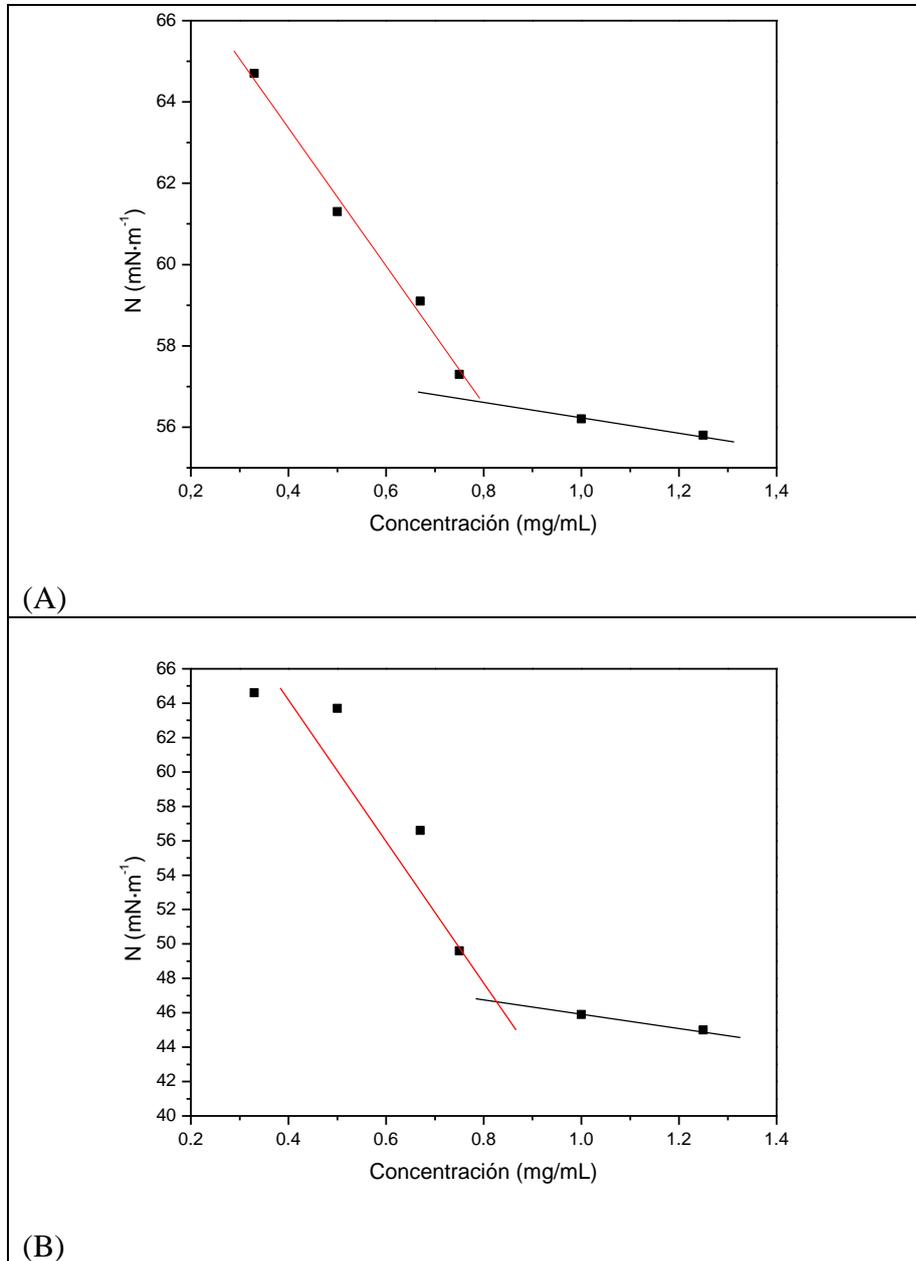


Figura 22. Representación de la tensión superficial frente a la concentración: (A) para el derivado de quitosano-cariofileno 7; (B) para el derivado quitosano-cumarina 4.

**CAPITULO 2 IMINAS Y AMINAS
SECUNDARIAS DERIVADAS DE
QUITOSANO**

2.1 Antecedentes

La unión de fragmentos aromáticos y heteroaromáticos al esqueleto del quitosano le proporciona nuevas propiedades o mejora sus características intrínsecas. Se obtienen de esta forma derivados de quitosano con propiedades interesantes como fluorescencia, actividad antibacterial aumentada^{69,70,71} y altas capacidades de adsorción en la recuperación de iones metálicos, nobles y de transición.⁷² Algunos métodos sintéticos usados para dicho acoplamiento son la *N*-acilación, la adición conjugada de los grupos amino a los compuestos α,β -insaturados, la aminación reductiva resultante de la reacción de aldehídos con quitosano y el acercamiento “síntesis en gel”.⁷² Entre estas estrategias la aminación reductiva tiene la ventaja de ser un procedimiento sencillo y versátil.

Se han descrito una variedad de reacciones de quitosano con aldehídos entre ellos el salicilaldehído, veratraldehído, 4-hidroxibenzaldehído, y cinamaldehído. El grupo fotosensible 2-hidroxi-3-metacrililoiloxipropoxi se ha acoplado a los aldehidos respectivos usando glicidil metracrilato.^{73,74}

Una estrategia de preparación de derivados fluorescentes de aminocompuestos en adición a las mencionadas y tratadas en el capítulo 1

⁶⁹ Dutta, P. K.; Duta, J.; Tripathi, V. S. *J. Sci. Ind. Res.* **2004**, *63*, 20–31.

⁷⁰ Sajomsang, W.; Ruktanonchai, U. R.; Gonil, P.; Warin, C. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82*, 1143–1152.

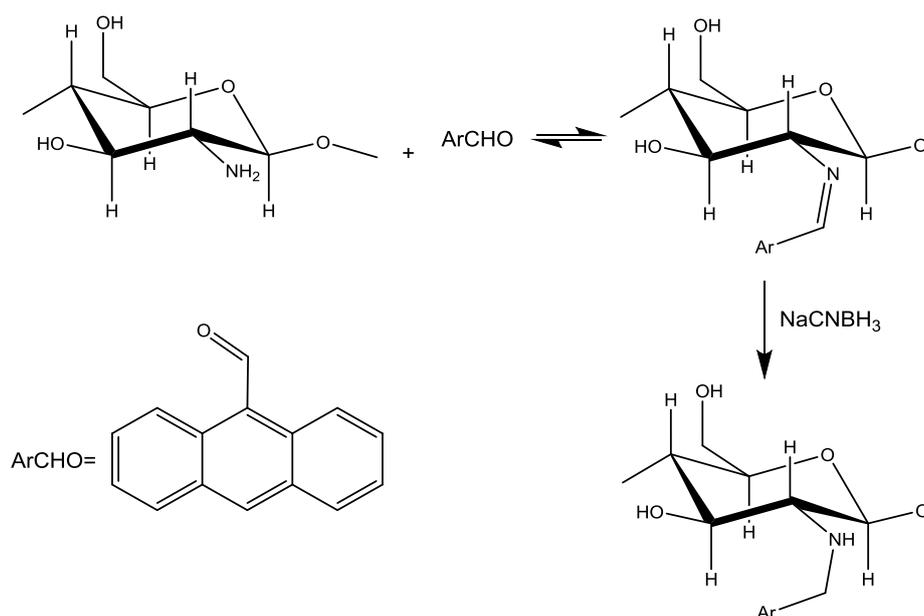
⁷¹ Sajomsang, W.; Tantayanon, S.; Tangpasuthadol, V.; Daly, W. H. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *72*, 740–750.

⁷² Bratskaya, S. Y.; Azarova, Y. A.; Matochkina, E. G.; Kodess, M. I.; Yatluk, Y. G.; Pestov, A. V. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 869–875.

⁷³ Muzzarelli, R. A. A.; Boudrant, J.; Meyer, D.; Manno, N.; DeMarchis, M.; Paoletti, M. G. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 995–1012.

⁷⁴ Muzzarelli, R. A. A. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *76*, 167–182.

de esta tesis es la aminación reductiva con aldehídos fluorescentes.^{36b} En el Esquema 13 se muestra la ruta sintética utilizada en la reacción del quitosano con el 9-formilantraceno, en la que se reduce la base de Schiff formada con cianoborohidruro de sodio (Esquema 13).^{36b}



Esquema 13. Reacción de aminación reductiva del quitosano con el 9-formilantraceno.

En adición a las aminaciones reductivas del quitosano con grupos aromáticos, se ha utilizado este procedimiento en la formación del derivado imino citral-quitosano que mejora la actividad antifúngica y expande el espectro antimicrobiano del quitosano.⁷⁵ También se ha utilizado la aminación reductiva en la formación de *N*-carboximetilquitosano,⁷⁶ en los acoplamiento del quitosano a carbohidratos para proporcionarle al

⁷⁵ Jin, X.; Wang, J.; Bai, J. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 825–829.

⁷⁶ Mourya, V. K.; Inamdar, N. N.; Tiwari, A. *Adv. Mater. Lett.* **2010**, *1*, 11–33.

biopolímero sitios de receptores para biomoléculas,^{77,78} en el acoplamiento de dendrímeros para obtener materiales con distintas propiedades incluyendo catálisis⁸⁶⁻⁸⁸ o en la unión con ciclodextrinas con potencial farmacéutico.¹⁷ Además de realizar la aminación reductiva con pequeños azúcares como monosacáridos, disacáridos⁷⁹ y oligosacáridos, también se ha hecho con un dextrano, obteniéndose en ese último caso un grado de sustitución del 17%.⁸⁰

En los últimos años, las iminas o bases de Schiff han despertado enorme interés en bioquímica y biomedicina como consecuencia de sus propiedades únicas.⁸¹ Se sabe que los complejos de bases Schiff actúan como modelos enzimáticos biomiméticos, indicadores fluorescentes, transportadores de oxígeno, agentes antimicrobianos, etc.⁸² Muy recientemente, Jia y Li⁸³ han revisado las ventajas de usar interacciones covalentes basadas en bases de Schiff para construir sistemas moleculares complejos (*Molecular Assembly*) y las aplicaciones novedosas que los sistemas resultantes pueden presentar. Según estos autores, en comparación con otros métodos covalentes de unión, incluida “click chemistry”, las uniones de tipo imina o base de Schiff proporcionan extraordinaria reversibilidad relacionada con cambios en los valores del pH, de forma que su estabilidad disminuye a medida que

⁷⁷ Oestrom, G. E.; Reek, J. N. H.; Kramer, P. C. J.; Van Leeuwen, P. W. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1828.

⁷⁸ Sashiwa, H.; Shigemasa, Y.; Roy, R. *Macromolecules* **2000**, *33*, 6913.

⁷⁹ Sashiwa, H.; Shigemasa, Y. *Carbohydr. Polym.* **1999**, *39*, 127–138.

⁸⁰ Yalpani, M.; Hall, L. D. *Macromolecules* **1984**, *17*, 272–281.

⁸¹ Saito, H.; Hoffman, A. S.; Ogawa, H. I. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2007**, *22*, 589.

⁸² Antony, R.; Theodore, D., S.; Karuppasamy, K.; Sanjeev, G.; Balakumar, S. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *124*, 178–186.

⁸³ Jia, Y.; Li, J. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 1597–1621.

disminuye el pH. Esta característica es de notable interés para la liberación de fármacos específicos desencadenados por el pH.

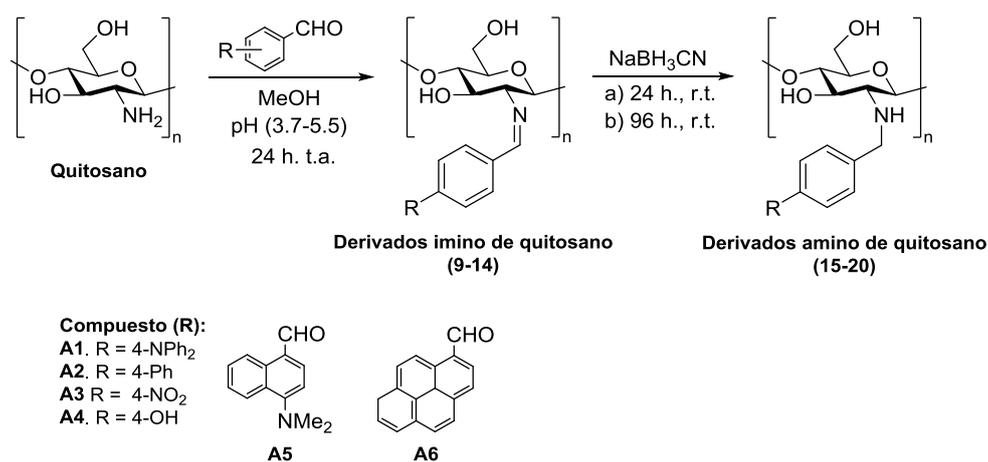
Por todo ello, la obtención de nuevas bases de Schiff y aminas secundarias derivadas de quitosano abre un perfil interesante de productos debido a la manera directa y sencilla en que pueden ser preparados, con una etapa de reducción separando el derivado imino del amino, la quimioselectividad del proceso la actividad antimicrobiana mejorada comparada con el quitosano y la mencionada reversibilidad controlada por pH de los sistemas basados en uniones de tipo imina o base de Schiff, de especial interés para aplicaciones en biomedicina.

2.2 Resultados y Discusión

2.2.1 *Formación de bases de Schiff y aminas secundarias derivadas de quitosano*

La síntesis de las bases de Schiff, **9-14**, y las aminas secundarias derivadas de quitosano, **15-20**, se llevó a cabo como se describe en la sección experimental y como se muestra en el Esquema 14. Dependiendo de las condiciones de reacción (Tabla 4), diferentes rendimientos y grados de sustitución fueron obtenidos. En particular, para las aminas secundarias derivadas de quitosanos el efecto del agente reductor debe ser considerado. Como se ve para el compuesto **17**, agregar un agente reductor al principio de la reacción reduce el DS de 55.3 a 19% (Tabla 4, entradas 6 y 9, respectivamente). Por otro lado, NaBH₃CN resultó ser más eficiente que

NaBH₄ en reducir los derivados las iminas **12** y **13** para dar los aminoquitosanos derivados **18** y **19** (Tabla 4, entradas 10-11 y 14-15).



Esquema 14. Síntesis de quitosanos imino y amino secundarios **9-20**.

Tabla 4. Aminas secundarias derivadas de quitosanos Condiciones de reacción y grados de sustitución (DS) mediante ¹H RMN (50 % CD₃COOD).

Entrada	Aldehído de partida	Condiciones de reacción ^a	Producto	DS (mol %)	Rto. ^b (%)
1	A1	1. EtOH, 24 h, pH 3.7, t.a. 2. NaBH ₃ CN, 48 h	15	10.2	86
2	A1	1. MeOH, 24 h, pH 3.7, r.t. 2. NaBH ₃ CN, 24 h	15	30.4	88
3	A1	1. MeOH, 24 h, pH 5.5, t.a. 2. NaBH ₃ CN, 24 h	15	26.0	92
4	A1	1. MeOH, 24 h, pH 3.7, t.a. 2. NaBH ₃ CN, 48h	15	40.0	87
5	A2	1. MeOH, 24 h, pH 3.7, t.a. 2. NaBH ₃ CN, 48h	16	NS	–
6	A3	1. MeOH, 24 h, pH 3.7, t.a. 2. NaBH ₃ CN, 24h	17	55.3	82
7	A3	1. MeOH, 3 h, pH 3.7, t.a.	17	47.2	79

		2. NaBH ₃ CN, 3 h			
8	A3	1. MeOH, 24 h, pH 3.7, 50°C 2. NaBH ₃ CN, 24h	17	47.9	95
9	A3	1. MeOH, NaBH ₃ CN, 48h, pH 3.7, t.a.	17	19.0	91
10	A4	1. MeOH, 24 h, pH 3.7, t.a. 2. NaBH ₃ CN, 24h	18	51.3	80
11	A4	1. MeOH, 24 h, pH 3.7, t.a. 2. NaBH ₄ , 48 h	18	28.4	83
12	A4	1. MeOH, 24 h, pH 5.2, t.a. 2. NaBH ₄ , 48 h	18	25.1	83
13	A4	1. MeOH, 72 h, pH 6.0, t.a. 2. NaBH ₄ , 48h	18	12.7	82
14	A5	1. MeOH, 24 h, pH 3.7, t.a. 2. NaBH ₃ CN, 24 h	19	46	88
15	A5	1. MeOH, 72 h, pH 3.7, t.a. 2. NaBH ₄ , 24 h.	19	10.2	91
16	A6	1. MeOH, 24 h, pH 3.7, t.a. 2. NaBH ₃ CN, 24 h.	20	NS	–

^aQuitosano fue tratado con la cantidad correspondiente de aldehído de partida (0.7 mol/eq) en el paso 1 cada entrada

^bRendimiento(%) = $\text{Peso de quitosano } N\text{-sustituido} / \text{quitosano (g)} \times [166.72 / (\text{peso del quitosano (g)} \times \text{FW del } N\text{-substituted GlcN calculado})] \times 100$; FW del GlcN *N*-substituted = $M_{w\text{Glc}} + \text{DS}_d \times (M_{w\text{ArCHO}} - 16.0)$. NS: insoluble.

Es relevante indicar que en nuestro procedimiento de síntesis el quitosano está en suspensión, no disuelto, en MeOH. Esta estrategia ofrece distintas ventajas ya que en solución: (1) para separar el producto nuevo, se requiere que el quitosano disuelto se precipite o se liofilice, que es un proceso que involucra un consumo extra de tiempo. (2) Para el quitosano que utilizamos ($M_w = 97600 \text{ g mol}^{-1}$) el aumento de la viscosidad con el aumento de la concentración de quitosano limita la concentración final disuelta del polímero, lo que limita la cinética de la reacción, mientras que en suspensión en MeOH no hay esa limitación.

Aunque la síntesis las aminas secundarias derivadas de quitosano utilizando los aldehídos 4-nitroxibenzaldehído y 4-hidroxibenzaldehído ha sido previamente descrita,⁸⁴ usando nuestras condiciones de reacción no se requiere diálisis y se obtienen grados de sustitución más altos. Las estructuras químicas nuevas se estudiaron mediante FTIR, HPLC/SEC, UV-Vis y espectroscopia de fluorescencia en comparación con el quitosano y los aldehídos de partida.

2.2.2 *Caracterización de bases de Schiff y aminas secundarias derivadas de quitosano por FTIR*

Con respecto al espectro FTIR, la formación de las iminas y las aminas secundarias derivadas de quitosano implica la pérdida de las bandas características de la absorción de formilo, entre ellas la banda de tensión de C=O alrededor de 1670 a 1702 cm^{-1} , la observación de las bandas características (tensión C=C y C-C y C-H fuera de plano) para la parte aromática, entre 1400 y 1500 cm^{-1} y de 1000 a 620 cm^{-1} , y la presencia de la tensión C=N en el derivado imino.

Las bandas de IR características de los imino y amino derivados de quitosano, en comparación con las de los correspondientes aldehídos de partida, se recogen en la Tabla 5. Las la tensión C=N de la imina, está en el rango de 1623-1643 cm^{-1} , mientras que la tensión de C-H de la amina es observada entre 1057-1063 cm^{-1} . Comparado con el espectro IR de quitosano, todos los derivados imino y amino secundarios tienen bandas de

⁸⁴ Sajomsang, W.; Tantayanon, S.; Tangpasuthadol, V.; Thatte, M.; Daly, W. H. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, *43*, 79–87.

absorción adicional a los números de onda 1600, 1510, 1452 y 700-850 cm^{-1} asignados a la tensión C=C y ala flexión C-H de los anillos aromáticos.

Los compuestos **11** y **17** muestran las bandas características de NO_2 (1519, 1346 cm^{-1} y 1515, 1372 cm^{-1} , y los compuestos **13** y **19** muestran bandas alrededor de 2950 cm^{-1} , correspondiendo a la banda de tensión C-H del grupo $\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

Tabla 5. Bandas IR características de los aldehídos de partida, iminas (**9-14**) y aminas secundarias (**15-20**) derivadas de quitosano.

Aldehído de partida	$\nu(\text{C=O}) \text{ cm}^{-1}$ Aldehído	$\nu(\text{C=N}) \text{ cm}^{-1}$ Imina	$\nu(\text{C-H}) \text{ cm}^{-1}$ Amina
A1	1686	1636	1064
A2	1693	1638	1062
A3	1703	1643	1061
A4	1683	1637	1062
A5	1673	1635	1063
A6	1678	1623	1061

2.2.3 Caracterización de aminas secundarias derivadas de quitosano por $^1\text{H RMN}$

Los amino derivados de quitosano que se disolvieron completamente en medio ácido (**15**, **17-19**) fueron estudiados mediante RMN en solución. Disolvimos estas muestras en 50 % CD_3COOD , procedimiento más suave y conveniente que adquirir el espectro a 70 °C,⁸⁵ o llevar cabo el experimento de RMN en $\text{DCl}^{86,87}$ o en $\text{D}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}^{88}$ (1%, v/v) % CD_3COOD . A tales

⁸⁵ Heux, L.; Brugnerotto, J.; Desbrieres, J.; Versali, M. -F.; Rinaudo, M. *Macromol.* **2000**, *1*, 746–751.

⁸⁶ Fernandez-Megia, E.; Novoa-Carballal, R.; Quiñoá, E.; Riguera, R. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *61*, 155–161.

⁸⁷ Kasaai, M. R. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1667–1676.

concentraciones de CD_3COOD , fue posible observar claramente a 300 K la señal de H-1 GlcNH₂ (4.94 ppm), el H-1 GlcNAc (4.65 ppm) y la región aromática (6.5 to 8.0 ppm), debido a que no había interferencia provocada por la señal del H₂O (~ 5.68 ppm)

En estas condiciones el grado de sustitución (DS) del derivado de quitosano pudo ser cuantificado no sólo mediante la comparación de la integral aromática vs. la integral de H-2, sino también vs la integral del H-1.

Para los amino derivados de quitosano, la cuantificación del DS (Tabla 4) se llevó a cabo utilizando la ecuación (8), donde $I_{\text{Ar}/n}$, donde $I_{\text{Ar}/n}$, es la integral de la señal aromática, n el número de protones aromáticos, y $I_{\text{H-2}_{\text{GlcN}}} + I_{\text{H-2}_{\text{GlcNR}}}$ representa la integral de H-2 (señales superpuestas) del esqueleto del quitosano. El grado de desacetilación (DD) puede ser también calculado usando la ecuación (9).

$$\text{DS (mol\%)} = \left[\frac{I_{(\text{Ar}/n)}}{I_{\text{H-2}_{\text{GlcN}}} + I_{\text{H-2}_{\text{GlcNCH}_2\text{Ar}}}} \right] \times \text{DD} \quad (8)$$

$$\text{DD (mol\%)} = \left[\frac{I_{\text{H-1}_{\text{GlcN}}}}{I_{\text{H-1}_{\text{GlcN}}} + I_{\text{H-1}_{\text{GlcNAc}}}} \right] \times 100 \quad (9)$$

Como se muestra en la Tabla 4, el DS mas alto corresponde al amino derivado **17** (DS 55.3 %, entrada 6), mientras que **15**, que fue preparado en EtOH (DS 10.2%, entrada 1), y **19** (DS 10.2%, entrada 15) tienen el más bajo DS. En general, los mejores DS para los amino derivados de quitosano se dieron en MeOH, pH 3.7 a temperatura ambiente y con la reducción subsiguiente con NaBH_3CN para los cuales, en estas condiciones, la

⁸⁸ Sajomsang, W.; Tantayanon, S.; Tangpasuthadol, V.; Daly, W. H. *Carbohydr Res.* **2009**, *344*, 2502–2511.

correspondiente disminución en DS fue en la forma **17>18>19>15 (16 y 20 no solubles)**.

2.2.4 Caracterización de bases de Schiff y aminas secundarias derivadas de quitosano por ^{13}C CPMAS RMN

Aunque la caracterización de las bases de Schiff de quitosano ha sido previamente descrita mediante ^1H RMN de líquidos^{89,90} observamos, tal como era de esperar, que el disolvente ácido deuterado (0.46 % DCl, 1% CD_3COOD) requerido para disolver las muestras hidroliza la imina para dar los correspondientes aldehídos (Figura 23). Por lo tanto, la caracterización y cuantificación de estos compuestos debe ser hecha mediante ^{13}C CPMAS RMN de estado sólido. Adicionalmente, debido al inconveniente de la baja solubilidad de algunos amino derivados de quitosano en CD_3COOD , nosotros recurrimos al ^{13}C CPMAS RMN de estado sólido para analizar todos los derivados amino de quitosano. Sus DS fueron cuantificados mediante ^{13}C CPMAS RMN usando la ecuación (10), y estos se muestran en Tabla 6.

⁸⁹ Guinesi, L. S.; Cavalheiro, E. T. G. *Thermochim Acta* **2006**, *444*, 128–133.

⁹⁰ Dos Santos, J. E.; Dockal, E. R.; Cavalheiro, E. T. G. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *60*, 277-282.

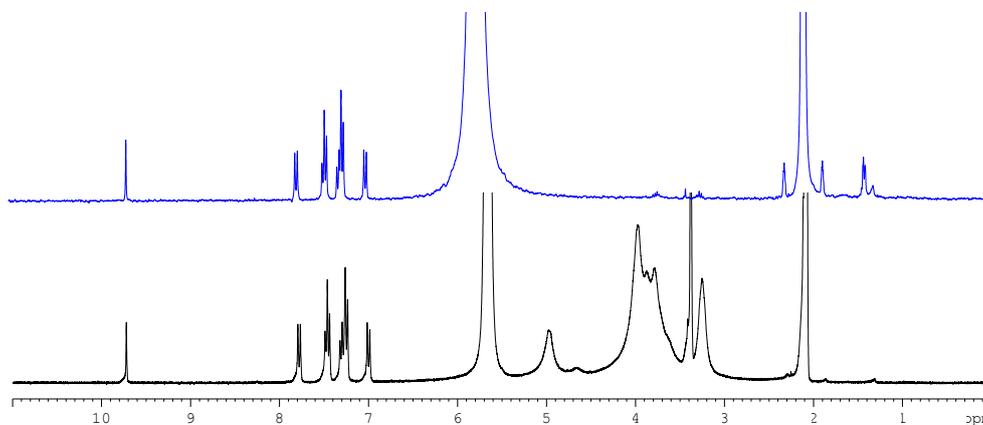


Figura 23. Espectro ^1H RMN (500 MHz) del *N*-(4-difenilaminobenciliden)quitosano (**9**) hidrolizado (negro) y 4-*N*-difenilaminobenzaldehído (**2**) (azul), ambos disueltos en 50% CD_3COOD .

$$\text{DS (mol\%)} = \left[\frac{I_{\text{Ar/n}}}{I_{\text{C-1}}} \right] \times 100 \quad (10)$$

$$\text{DS (mol\%)} = \left[\frac{I_{\text{N(CH}_3)_2/2}}{I_{\text{C-1}}} \right] \times 100 \quad (11)$$

La integración de los carbonos aromáticos se llevó a cabo tomando la toda la región aromática y comparando su área con el C-1 del quitosano. El DD puede ser también calculado del espectro integrando el CH_3 (23 ppm) y/o la región $\text{C}=\text{O}$ (173 ppm) y comparando con la integral de C1 del quitosano, mediante la ecuación (11).

Usando este procedimiento, como se muestra en la **¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.** la imina con el valor más alto de DS fue **11** (31.7%) y el de más bajo fue **9** (2.0%), siendo el orden de disminución del DS **11>10>12>13>14>9**. Al mismo tiempo, la amina con el DS más alto fue **16** (34.4%) seguido por **17** (31.7%) y el de valor más bajo fue **15** (13.8%), siendo el orden de disminución del DS **16>17>18>19>20>15** y por tanto de acuerdo con los resultados obtenidos

mediante ^1H RMN en solución. La señal $\text{C}=\text{N}$ de la imina derivada estaba en el rango de 162.8-168.4 ppm.

Tabla 6. Iminas^a y aminas secundarias derivadas de quitosanos.^b Análisis mediante ^{13}C CPMAS RMN.

Derivado Quitosano	Señal de Imina (ppm)	<i>N</i> -sustitución promedio (DS) (mol %) ^c	DD (mol %)
9	162.8	12.0	84
15^d	–	13.8	84
10	168.4	30.4	84
16^e	–	34.4	85
11	165.1	31.7 48 ^f	85
17	–	31.7	85
12	168.4	23.8 22 ^f	85
18	–	31.4	85
13	167.7	19 27.4 ^g	85
19	–	28.6 43.5 ^g	85
14	165.6	17.6	86
20	–	24.2	86

^a Todos los derivados imino de quitosano fueron sintetizados en MeOH, 24 h, pH 3.7, t.a.

^b Todos los derivados amino fueron sintetizados por un proceso de dos etapas: 1. MeOH, 24 h, pH 3.7, t.a.; 2. NaBH₃CN, 24h, a menos que sea indicado de otra forma.

^c Cuantificados mediante ^{13}C CPMAS RMN en sólido estado using eq. (3), a menos que sea indicado de otra forma.

^d A pH 5.5 para la etapa 1 de la síntesis.

^e El tiempo para la etapa 2 de la síntesis fue 48 h.

^f Cuantificados mediante ^{13}C CPMAS RMN en sólido estado tomando en consideración $I_{\text{C}=\text{N}}/I_{\text{C1}}$

^g Cuantificados mediante ^{13}C CPMAS RMN en sólido estado tomando en consideración $I_{\text{NMe2}}/I_{\text{C1}}$

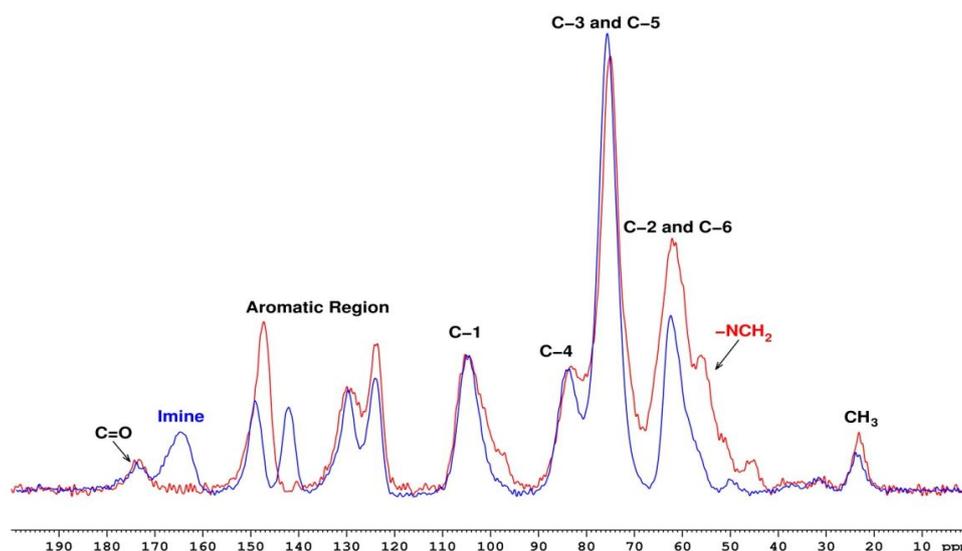


Figura 24. Comparación del derivado imino **11** (azul) y el quitosano amino secundario **17** (rojo) mediante ^{13}C CPMAS RMN spectra.

2.2.5 Comparación de los DS calculados mediante RMN en solución y en estado sólido

Como se observa en la Tabla 4 y Tabla 6, para las aminas secundarias derivadas de quitosano preparadas en las mismas condiciones, el DS calculado mediante ambos RMN en solución y RMN en estado sólido sigue el mismo orden de disminución. Sin embargo, los valores obtenidos por ambas técnicas no son iguales; siendo los DS obtenidos mediante ^{13}C CPMAS RMN siempre más bajos. Para justificar estos resultados varios conceptos deben considerados. El espectro ^{13}C CPMAS RMN en estado sólido proporciona una representación cuantitativa del contenido de carbono en moléculas orgánicas estándar y es asumido que es cuantitativo.^{91,92} Sin

⁹¹ Conte, P.; Spaccini, R.; Piccolo, A. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2004**, *44*, 215–223.

⁹² Knicker, H. *Org. Geochem.* **2011**, *42*, 867–890.

embargo, problemas de cuantificación debido a la polarización cruzada ineficiente pueden ser observados para carbonos a distancia de más de tres enlaces al ^1H más cercano. Se ha descrito que los carbonos cuaternarios no están eficientemente polarizados y pueden ser subestimados debido a su deficiencia de protones, esto dificulta la CP y consecuentemente la detección de la señal.⁹³ Sin embargo, otro mecanismo de transferencia de magnetización, conocido como difusión de spin, puede darse en estado sólido y que puede claramente hacer aumentar la polarización cruzada. El efecto principal del fenómeno del *spin diffusion* es que ambas, las CP intra e intermolecular, que dependen de la densidad de protones dentro de los sistemas heterogéneos, llegan a hacerse posibles y entonces los carbonos cuaternarios posicionados en la proximidad de las regiones con alta densidad de protones pueden ser visibles mediante CPMAS. En nuestro caso, la difusión de spin podría ocurrir entre las unidades del azúcar y las unidades aromáticas. Estos efectos deben ser críticos para obtener una intensidad máxima de los carbonos cuaternarios contenidos en nuestras unidades aromáticas y por lo tanto obtener valores de DS precisos. Una correlación lineal ($r^2 = 0.992$) entre los DS obtenidos mediante ^1H RMN para los amino derivados de quitosano y aquellos obtenidos mediante ^{13}C CPMAS RMN nos han permitido (**Figura 25**) calcular un factor empírico de correlación (ecf) (tipo $y = mx + b$, donde $m = 1.64$, y $b = 1.07$) (ecf = 1.64) que podría ser aplicado en sistemas aromáticos basados en quitosano.

⁹³ Smernik, R. J.; Oades, J. M. *Geoderma*, **2000**, *96*, 101–129.

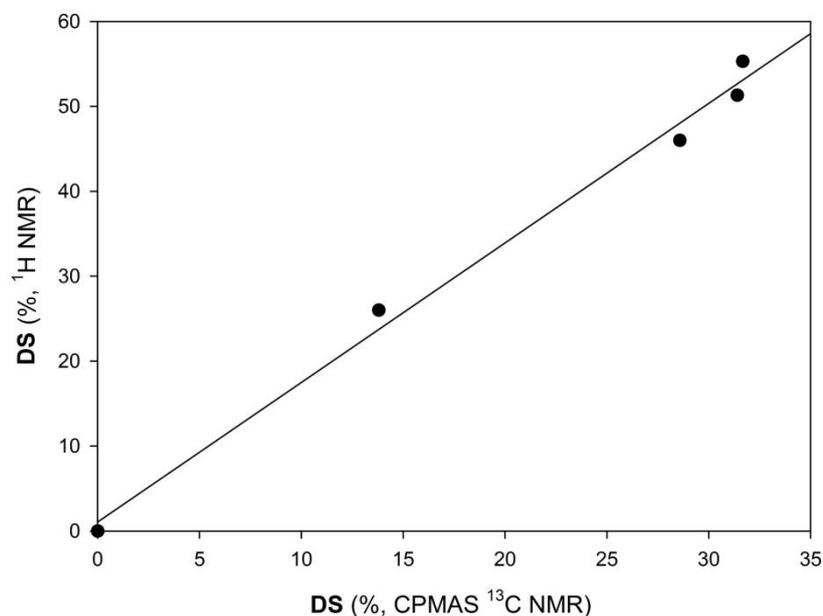


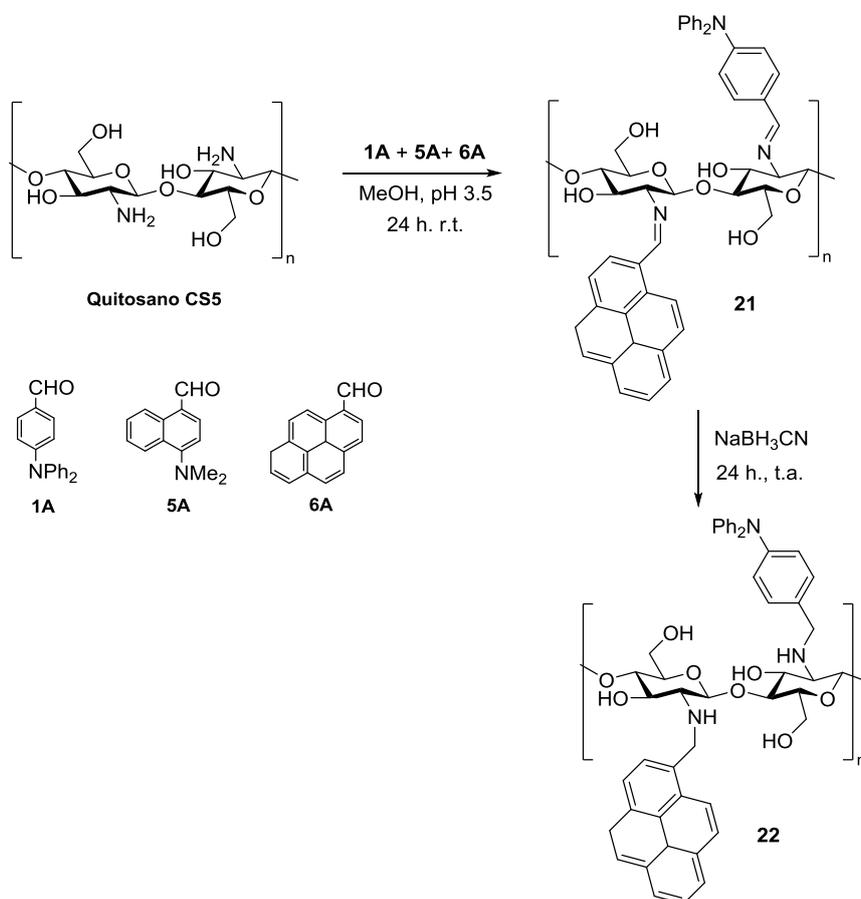
Figura 25. DS obtenido para las aminas secundarias derivadas de quitosano mediante ^1H RMN vs. aquellos obtenidos mediante CPMAS ^{13}C RMN.

Los valores de incorporación (DS) calculados para los imino derivados de quitosano se corresponden con los valores esperados en base a los conceptos de electrofilia y efecto estérico de los aldehídos que reaccionan. Así, los derivados **9**, **13**, y **14** tienen valores más bajos de incorporación que **10**, **11**, y **12** bajo condiciones de reacción similares (Tabla 6).

2.2.6 Reacción simultánea de diferentes aldehídos con quitosano

Con el fin de obtener un biopolímero que expone moléculas con diferentes propiedades fisicoquímicas, cantidades equimolares de los aldehídos 4-*N,N*-difetilaminobenzaldehído, 4-*N,N*-dimetilamino-1-naftaldehído, y 1-pirencarboxaldehído, fueron agregadas a la suspensión metanólica de quitosano. Después de 24 h. la mezcla fue reducida con NaBH_3CN por 24 h. (Esquema 15). Del análisis del espectro ^{13}C CPMAS

RMN en estado sólido (una comparación del espectro ^{13}C CPMAS RMN del imino derivado de quitosano **21** con los de los compuestos **9**, **13** y **14** se muestra en la Figura 26), el grado de *N*-sustitución de la base de Schiff **21** fue 17.2 % para la unidad *N*-pirenbenzilideno y 2.6 % para la unidad *N*-difenilaminobencilideno y para el amino derivado de quitosano **22** el DS fue 12.4% de la unidad *N*-pirenebencilo y 5.5 % el de la unidad *N*-difenilaminobencilo.



Esquema 15. Síntesis de los quitosanos imino y quitosano amino secundario **21** y **22** por reacción simultánea de los aldehídos 4-*N,N*-difenilaminobenzaldehído, 4-*N,N*-dimetilamino-1-naftaldehído, and 1-pirencarboxaldehído con quitosano.

Los resultados de estas reacciones fueron, en principio, inesperados debido a que ni el ^{13}C CPMAS RMN ni los espectros FT-IR, ultravioleta o fluorescencia muestran la presencia de 4-*N,N*-difenilaminobenzaldehído en ambos el imino y amino derivados de quitosano obtenidos.

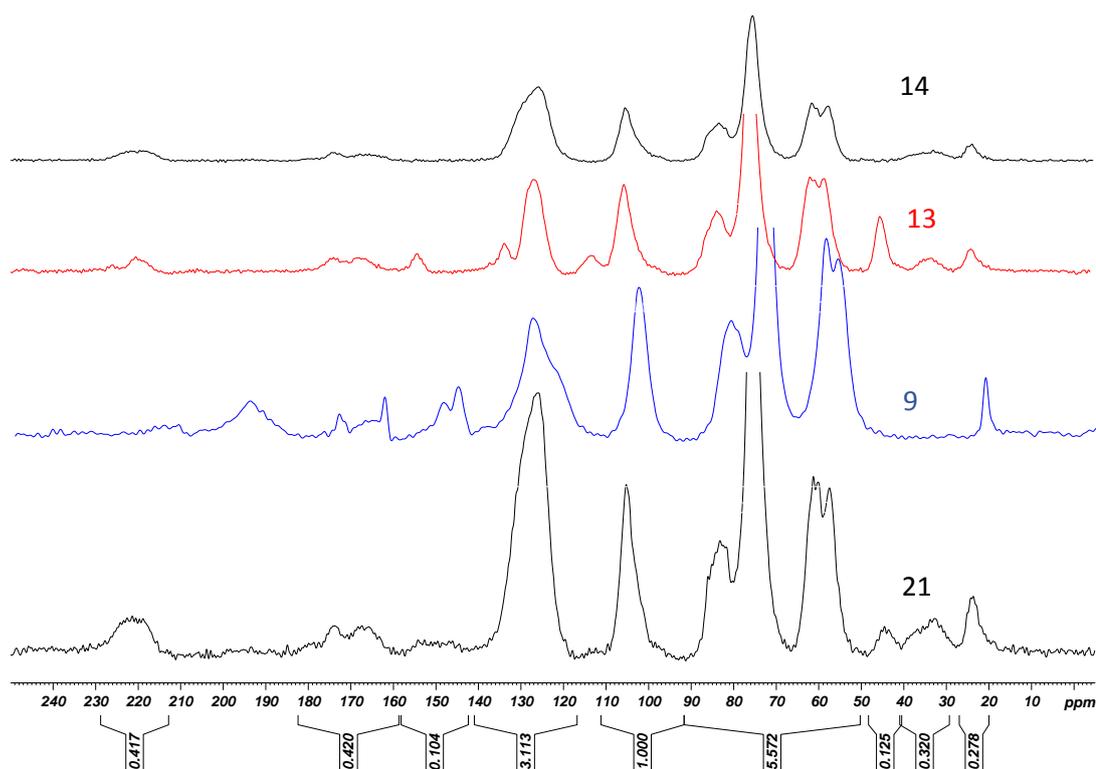


Figura 26. Espectro de ^{13}C CPMAS RMN de los compuestos **21** (negro, abajo), **9** (azul), **13** (rojo) and **14** (negro, arriba).

Para tratar de explicar nuestros resultados llevamos a cabo estudios cinéticos de las reacciones de quitosano con los aldehídos 4-*N,N*-difenilaminobenzaldehído, 4-*N,N*-dimetilamino-1-naftaldehído, y 1-

pirencarboxaldehído (cada uno en una reacción separada) con un exceso de quitosano (Figura 27). Los resultados obtenidos muestran que el 1-pirencarboxaldehído reacciona más rápido que 4-*N,N*-dimetilamino-1-naftaldehído y 4-*N,N*-difenilaminobenzaldehído, vemos que su absorbancia cae a su valor original en 43 min (Figura 27), mientras que el 4-*N,N*-difenilaminobenzaldehído tarda 60 min y el 4-*N,N*-dimetilamino-1-naftaldehído, más de 200 min. Ésto, por lo tanto, explica la más baja incorporación del 4-*N,N*-diphenylaminobenzaldehído, el cual es segundo en reaccionar con el quitosano, y el fallo de la incorporación del 4-*N,N*-dimetilamino-1-naftaldehído.

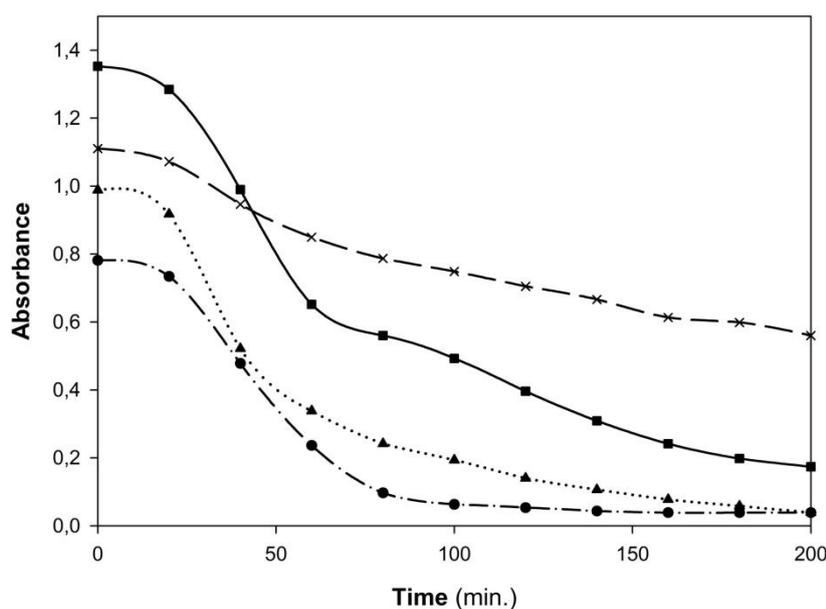


Figura 27. Estudio cinético de las reacciones de quitosano con aldehídos. En este gráfico los círculos corresponden a la reacción del aldehído 4-nitrobenzaldehído; triángulos al aldehído 1-pirencarboxaldehído; cuadrados para el aldehído 4-*N,N*-difenilaminobenzaldehído; cruces al aldehído 4-*N,N*-dimetilamino-1-naftaldehído.

Solamente aquellos amino derivados menos viscosos o que muestran menos tendencia a formar partículas pequeñas, **16-19**, y el quitosano de partida fueron usados para los estudios de HPLC/SEC (Tabla 7). Normalmente, las muestras tenían que ser solubilizada previamente a concentraciones más altas de CH₃COOH y entonces diluidas en la fase móvil, que fue 0.2 M CH₃COOH y 0.1 M NH₄OAc para disminuir la formación de agregados.⁹⁴ Los pesos moleculares determinados para los derivados de quitosano fueron mayores que para el quitosano de partida. En particular, los M_w determinados están en el rango de 102000 a 123200 g mol⁻¹, siendo 97600 g mol⁻¹ el del quitosano de partida. Consecuentemente, la depolimerización del quitosano de partida no ocurre bajo las condiciones de reacción empleadas.

Tabla 7. Datos HPLC/SEC para aminas secundarias derivadas de quitosano en comparación con el quitosano de partida.

Derivado de quitosano	Tiempo de retención (min)	M_n (g mol⁻¹)	M_w (g mol⁻¹)	M_p (g mol⁻¹)
16	14.0	75800	123200	99500
17	14.4	70700	110400	98200
18	14.2	71000	117800	95100
19	14.6	64100	102000	115500
Quitosano de partida (CS5)	14.9	60500	97600	94100

2.2.7 Propiedades fotofísicas y detección de polaridad

⁹⁴ Lamarque, G.; Lucas, J. M.; Viton, C.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 131–142.

La absorción UV-vis y las propiedades de fluorescencia de los amino derivados de quitosano sintetizados, **15-22**, fueron estudiados y comparados con los aldehídos de partida relacionados (Tabla 8). Un desplazamiento de la banda de absorción en UV-vis, la cual está en el rango de 256 nm a 344 nm, a longitudes de onda más cortas en relación a las λ_{max} de los aldehídos de partida ($\Delta\lambda_{\text{max}}=11-71$ nm). Las amina secundarias derivadas de quitosano fluorescentes estudiadas (**15, 16, 19-22**) tienen una banda de emisión intensa en el rango de 315 nm a 379 nm (λ_{em1}), a longitudes de onda más bajas que su respectivas unidades activas y una segunda banda de menor energía a (λ_{em2}), a 395-463 nm.

Tabla 8. Absorbancia UV-vis y fluorescencia. Máximos de absorción y emisión para aldehídos fluorescentes y derivados *N*-sustituídos de quitosano en 0.17% CH₃COOH.

Compuesto	λ_{abs} (nm)	$\lambda_{\text{em 1}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em 2}}$ (nm)
4-<i>N,N</i>-difenilaminobenzaldehído	326		457
15	299	370	455
Bifenil-4-carboxaldehído	292		406
10	300		471
16	256	315	456
4-<i>N,N</i>-dimetilamino-1-naftaldehído	365		469
19	294	330	463
1-pirenecarboxaldehído	370		471
20	344	379	395
22	344	379	395

Es relevante el cambio significativo a longitudes de onda más bajas observado en el máximo de emisión y el aumento de fluorescencia observado para cada derivado de quitosano sintetizado con respecto al

aldehído de partida relacionado ($\Delta\lambda_{em1}=87-139$ nm). Este hecho puede ser consecuencia de la presentación multivalente de las unidades fluorescentes unidas al esqueleto del polímero [ver Figura 28, línea azul (a) y línea negra (b), para una comparación del espectro de emisión entre **16** y el bifeníl-4-carboxaldehído]. Como se espera el quitosano no tiene picos característicos [ver (c) en Figura 28, línea morada].

La posibilidad de desarrollar un sensor de polaridad fue explorado, en particular para detectar la presencia de trazas de disolventes no polares. Para este propósito, el espectro de emisión de *N*-(bifeniliden)quitosano (**10**) fue adquirido en 0.17% CH₃COOH aq. [Figura 28 (d), línea roja] mostrando El máximo de emisión = a 471 nm. Como un resultado preliminar, nosotros encontramos que la adición de cantidades crecientes de CH₂Cl₂ está acompañada de cambios drásticos en la longitud de onda y en intensidad de emisión. La banda inicial de emission a 471 nm disminuye progresivamente hasta que se reduce a un hombro después de agregar 20 μ L de CH₂Cl₂ [Figura 28 (e), línea verde]. Simultáneamente, un máximo de emisión a 406 nm, el que corresponde al bifeníl-4-carboxaldehído, es observado. Se puede adicionalmente inferir que la I_{406}/I_{471} puede dar información acerca de la concentración de CH₂Cl₂ en la muestra. Un valor de I_{406}/I_{471} más alto puede ser correlacionado con concentraciones de CH₂Cl₂ más altas y viceversa. El compuesto **10** puede ser considerado como un novedoso sensor fluorescente de polaridad que tiene además buena fotoestabilidad (Figura 28) e intensidad y biocompatibilidad de fluorescencia aumentada en comparación con el colorante orgánico libre bifeníl-4-carboxaldehído. Este comportamiento como sensor fluorescente de polaridad, unido a la quiralidad del esqueleto polimérico y a la posibilidad de modular el

comportamiento fluorescente variando la naturaleza del aldehído de partida utilizado, permite esperar que estos nuevos polímeros tengan aplicación como sensores polivalentes en sistemas biológicos.

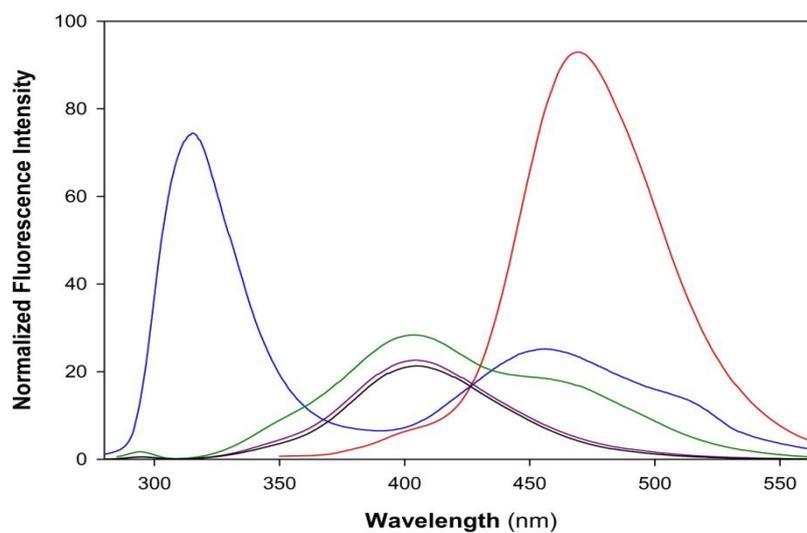


Figura 28. Espectro de emisión en 0.17% CH_3COOH aq. por excitación a 292 nm a menos que sea indicado de otra forma: (a) **16** (línea azul, excitación 256 nm); (b) bifenil-4-carboxaldehído (línea negra) (c) bifenil-4-carboxaldehído + quitosano (línea morada); (d) **10** (línea roja); (e) **10** + 20 μL CH_2Cl_2 (línea verde).

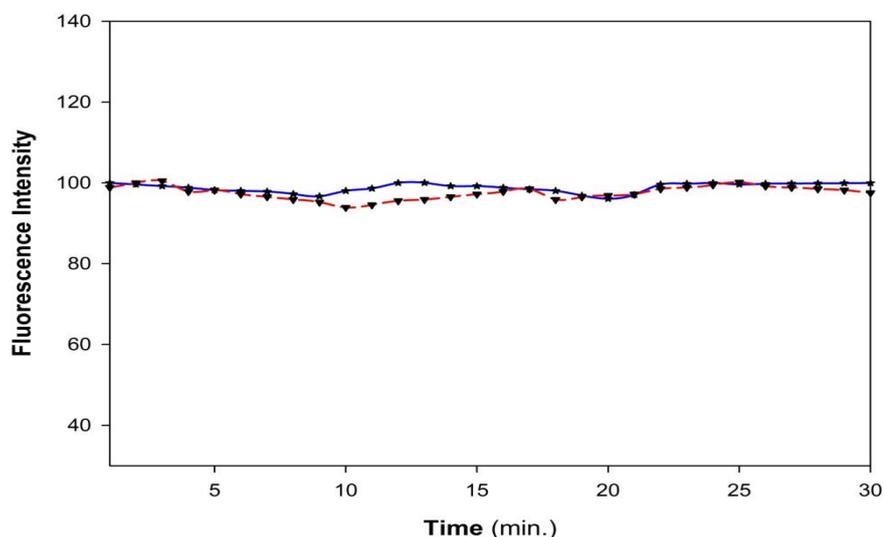


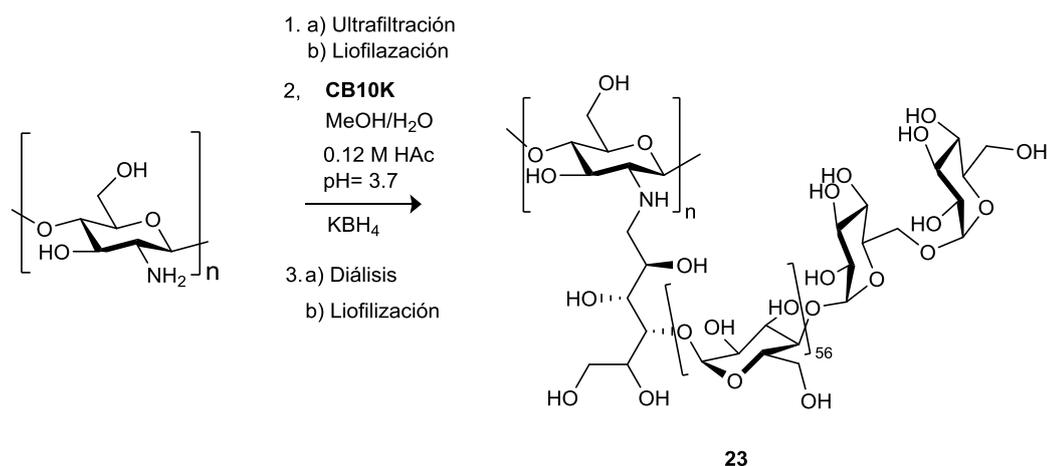
Figura 29. Comparación de la fotoestabilidad de bifeníl-4-carboxaldehído (decaimiento de emisión a 405 nm, azul) y el compuesto 10 (decaída de emisión a 471 nm, naranja).

2.2.8 Reacción de acoplamiento de polisacarídico polimatosídico en quitosano a través de aminación reductiva.

Se realizó la reacción de acoplamiento del quitosano **CS3** con un dextrano polimaltosídico principalmente lineal (**CBK10**), solamente ramificado en los extremos, concretamente en la posición 6 con glucosa de configuración α con un grado de polimerización (DP) aprox. del 56. El polímero es de un M_w aprox a 9500 g mol^{-1} .

En primera instancia se realizó la ultrafiltración del quitosano **CS3** con una membrana de $100000 \text{ g mol}^{-1}$, obteniéndose el ultraconcentrado que contiene las cadenas de quitosanos de mayor M_w . Una vez liofilizada la muestra se obtuvo el quitosano “ultraconcentrado” y subsecuentemente se realizó la aminación reductiva con el polisacarido polimaltosidico en disuelto

en una solución de 1:1 MeOH/H₂O que era 0.12 M en CH₃COOH, durante 72 horas de formación de imina y otras 72 horas de reducción con KBH₄ (Esquema 16). A continuación, La fracción del polisacárido sin reaccionar se eliminó con diálisis.



Esquema 16

El producto fue soluble en H₂O a temperaturas superiores a 80 °C y en base al análisis elemental realizado, que indica un contenido en nitrógeno muy bajo (de hecho, no detectable) podría concluirse que el grado de incorporación ha sido muy elevado, pues a mayor grado de incorporación menor es el valor del % de abundancia del N en la muestra. Yalpani et al⁸⁰. consiguen para otro dextrano un grado de incorporación de sólo el 17%.

La metodología empleada para esta reacción del quitosano con el polisacárido **CBK10** tiene dos aspectos destacados: al ultrafiltrar un quitosano de $M_w = 86352 \text{ g mol}^{-1}$ con una membrana de 100000, se reduce considerablemente la polidispersión de la muestra y por tanto al llevar a cabo una reacción se utilizan cadenas de quitosano de tamaños más

homogéneos (1); por otro lado, es una alternativa interesante para obtener un producto en el que se realiza una presentación multivalente de un polímero utilizando otro polímero como plataforma (2).

CAPITULO 3. UREAS
DERIVADAS DE QUITOSANO

3.1 Antecedentes

La relativa insolubilidad del quitosano en la mayor parte de los disolventes orgánicos lo hace ideal para aplicaciones como selectores quirales en fases estacionarias cromatográficas. Además, a diferencia de los derivados de otros polisacáridos (p. ej. benzoilderivados de amilosa), los benzoilderivados de quitosano presentan alta capacidad de diferenciación enantioselectiva para distintos compuestos racémicos.⁹⁵

Una de las de las metas específicas en la modificación del quitosano como selector quiral es aumentar el rango de disolventes empleados como eluyentes para fines cromatográficos. Esto representa una ventaja para propósitos analíticos y preparativos por la mayor posibilidad de optimización de la fase móvil y por tanto para lograr una mejor resolución de la fase estacionaria. Para dicho propósito Zhang et al.⁹⁶ han preparado derivados per-*N*-,*O*-sustituídos, concretamente catorce 3,6-difenilcarbamoil-2-ureil derivados de quitosano a partir de la reacción de isocianatos con muestras de quitosano completamente desacetiladas y estudiaron la capacidad de reconocimiento quiral de estos derivados como componentes de fases estacionarias quirales para HPLC. Los autores observaron diferente resolución quiral dependiendo del sustituyente en el grupo fenilo, obteniendo los mejores resultados para los derivados de quitosano que contienen 3,5-dimetilfenilo y 3,5-diclorofenilo como sustituyentes. Estas fases estacionarias quirales basadas en quitosano

⁹⁵ Franco, P.; Senso, A; Oliveros, L.; Minguillón, C. *J. Chromatogr. A* **2001**, *906*, 155–170.

⁹⁶ Zhang, L.; Shen, J.; Zuo, W.; Okamoto, Y. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1365*, 86–93.

presentan sobre las basadas en otros polisacáridos la ventaja de que amplían la fase móvil utilizada a combinaciones que contienen cloroformo.

Dentro de las limitaciones en la aplicación del quitosano como agente inmovilizante está su baja resistencia química y fuerza mecánica, lo que reduce significativamente su reutilización. La modificación del quitosano utilizando agentes entrecruzantes como glutaraldehído, epíclorhidrina, y diisocianatos se ha realizado para mejorar el tamaño de poro, la resistencia mecánica, la estabilidad química, la hidrofilia o la biocompatibilidad. Los diisocianatos se han utilizado para entrecruzar membranas de quitosano (diisocianato de tolueno, hexametil diisocianato)^{97,98} películas de quitosano (hexametil diisocianato),⁹⁹ como estrategia para acoplar el quitosano con polímeros sintéticos o naturales¹⁰⁰ o para aplicaciones en catálisis. En esta última aplicación, Martina et al.¹⁰¹ sintetizaron catalizadores basados en Cu(I) y Pd(II) usando quitosano como soporte. Con tal fin se entrecruzó el quitosano con hexametil diisocianato en presencia de la sal metálica. Los derivados *N,O* sustituidos basados en Cu(I)-quitosano fueron usados en la cicloaddición 1,3-dipolar de azidas y alquinos mientras que los basados en Pd(II) se utilizaron en los acoplamientos de Suzuki. En ambos tipos de catalizadores se obtuvo reciclabilidad, resistencia a altas temperaturas y una

⁹⁷ Devi, D. A.; Smitha, B., Sridhar, S.; Aminabhavi, T. M. *J. Membr. Sci.* **2005**, *262*, 91–99.

⁹⁸ Choudhari, S. K.; Kittur, A. a.; Kulkarni, S. S.; Kariduraganavar, M. Y. *J. Memb. Sci.* **2007**, *302*, 197–206.

⁹⁹ Campos, M. G. N., Satsangi, N., Rawls, H. R. and Mei, L. H. I. *Macromol. Symp.* **2009**, *279*, 169–174.

¹⁰⁰ Jayakumar, R.; Prabakaran, M.; Reis, R. L.; Mano, J. F. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *62*, 142–158.

¹⁰¹ Martina, K.; Leonhardt, S. E. S.; Ondruschka, B.; Curini, M.; Binello, A.; Cravotto, G. *Journal Mol. Catal. A, Chem.* **2011**, *334*, 60–64.

actividad catalítica superior que en otros catalizadores basados en quitosano-Cu o quitosano-Pd en los que no se utiliza el puente poliuretano/urea.

El hexametil diisocianato encuentra usos adicionales en la reacción con quitosano en aplicaciones biomédicas y ambientales,¹⁰² como material de apoyo para catalizadores de Pd usados en las reacciones de hidrogenación,¹⁰³ en la absorción del colesterol,¹⁰⁴ agente gelificante del aceite de ricino,¹⁰⁵ absorción de carcinógenos tóxicos,¹⁰⁶ absorción de oro,¹⁰⁷ o en elastómeros de poliuretano.¹⁰⁸

Aparte de las interesantes propiedades de los carbamoil-ureidil derivados de quitosano descritos hasta ahora como selectores quirales y en la inmovilización de catalizadores, cabe considerar que el carácter donador-aceptor-donador (DAD) de la función urea para formar puentes de hidrógeno podría, no sólo aumentar la afinidad con el agua si las funciones hidroxilo del quitosano permaneciesen libres, sino también la generación de estructuras supramoleculares en solución.¹⁰⁹ Con este objetivo nos propusimos estudiar las reacciones de quitosano con isocianatos y

¹⁰² Prabakaran, M.; Mano, J. F. Chitosan derivatives bearing cyclodextrin cavities as novel adsorbent matrices. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *63*, 153–166.

¹⁰³ Schüßlera, S.; Blaubach, N.; Stolle, A.; Cravottob, G.; Ondruschkaa, B. Application of across-linked Pd–chitosan catalyst in liquid-phase-hydrogenation using molecular hydrogen. *Appl. Catal. A-Gen* **2012**, *445–446*, 231–238.

¹⁰⁴ Chiu, S.; Chung, T.; Giridhar, R.; Wu, W. *Food Res. Int.* **2004**, *37*, 217–223.

¹⁰⁵ Gallego, R.; Arteaga, J.; Valencia, C.; Franco, J. M. *Molecules*, **2013**, *18*, 6532–6549.

¹⁰⁶ Zha, F.; Li, S.; Chang, Y. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *72*, 456–461.

¹⁰⁷ Arrascue, M. L.; Garcia, H. M.; Horna, O.; Guibal, E. Gold sorption on chitosan derivatives. *Hydrometallurgy* **2003**, *71*, 191–200.

¹⁰⁸ Ziaa, K. M.; Bhattia, I. A.; Barikanib, M.; Zuber, M.; Sheikh, M. A. XRD studies of chitin-based polyurethane elastomers. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, *43*, 136–14.

¹⁰⁹ K. B. Joshi, S. Verma, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2860.

diisocianatos controlando las condiciones de reacción para que sólo el grupo amino del quitosano, pero no sus funciones hidroxilo, reaccionen y se obtengan exclusivamente los ureidil derivados de quitosano.

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Reacción de isocianatos y diisocianatos con 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranosas

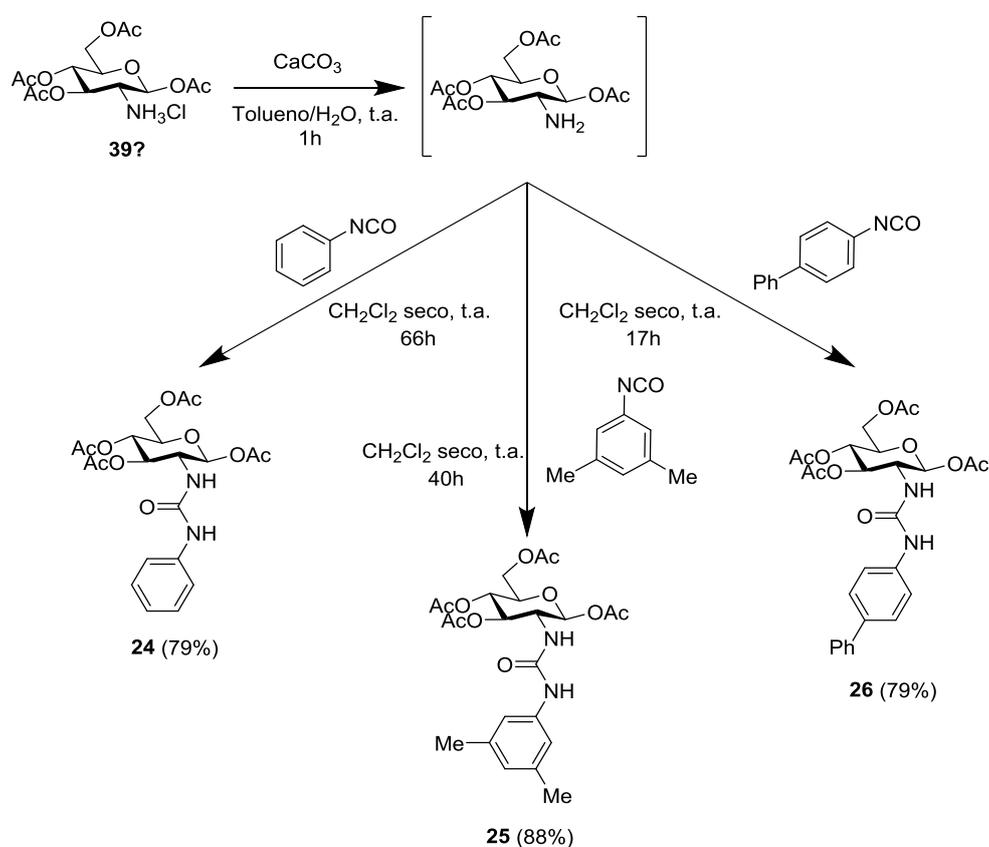
5.2. Síntesis de ureas lipofílicas derivadas de glucosamina

La síntesis de ureas se realiza a partir del clorhidrato de 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranosas (**40**), unidad monomérica del quitosano tetraacetilada, como modelo que nos podría permitir diseñar las condiciones de preparación y nos facilitaría el análisis espectroscópico de las ureas derivadas de quitosano que nos proponemos preparar.

Con objeto de liberar el grupo amino nucleófilo, previamente a la síntesis, el compuesto **40** se trata con CaCO_3 en una mezcla tolueno/ H_2O . Tras 1 h de reacción se aísla el derivado acetilado con el grupo amino libre y se disuelve en CH_2Cl_2 seco. La síntesis del compuesto **24** se llevó a cabo empleando el CH_2Cl_2 seco, obteniéndose un rendimiento del 79%. A la disolución diclorometánica mencionada se añade el correspondiente isocianato comercial y se obtienen así las ureas **24-26** como se muestra en el Esquema 17.

Se ha confirmado la estructura del compuesto **24** mediante ^1H RMN. Además de los picos característicos correspondientes a la unidad de glucosamina se encuentran dos multipletes con un desplazamiento químico

de 7.34-7.28 y 7.10 ppm respectivamente, ambos corresponden al grupo fenilo de la urea formada. También se comprueba la presencia de los dos protones correspondientes a los dos grupos NH de la urea, uno originando un singulete a 6.77 ppm y el otro un doblete a 5.07 ppm.



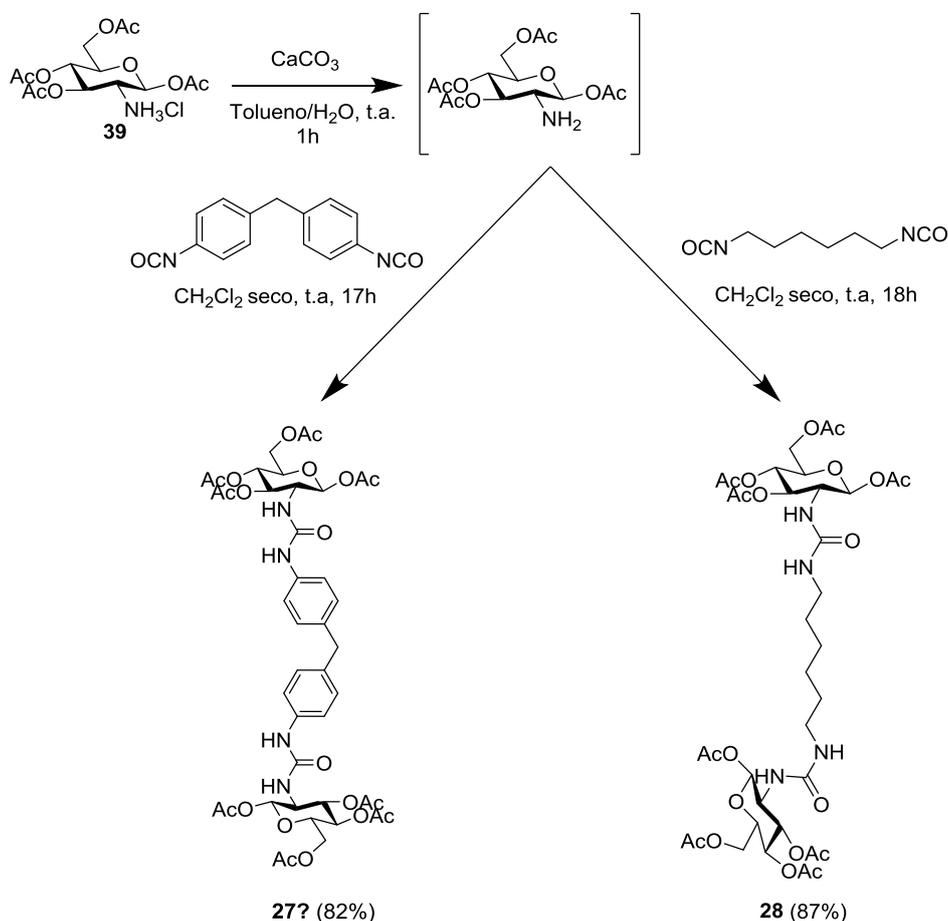
Esquema 17. Reacción de 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-amino-2-desoxi-β-D-glucopiranososa con isocianatos.

La reacción del compuesto **40** con el 3,5-dimetilisocianato da lugar al compuesto **25** con un rendimiento del 88%. Examinando su espectro de infrarrojo se puede concluir que posee el grupo urea ya que existe una banda a 1673 cm^{-1} . Además, presenta las bandas de tensión $\text{C}=\text{C}$ correspondientes

al anillo aromático, conjuntamente con los metilos sustituyentes del mismo. En el espectro de ^1H RMN se observan dos singuletes a 6.88 y 6.74 ppm respectivamente que corresponden a los protones aromáticos. Aparece otro singulete para seis protones a 2.27 ppm correspondiente a los dos grupos metilos presentes en el anillo fenilo incorporado a la glucosamina. La espectrometría de masas de alta resolución confirma la estructura **26** para el compuesto. Su espectro de FTIR no tiene grandes cambios con respecto al anterior y el espectro de ^1H RMN confirma su estructura, observándose entre 7.65-7.29 ppm las señales originadas por los protones de los dos grupos fenilos incorporados a la glucosamina.

Los espectros de ^{13}C RMN de los compuestos **25** y **26** apoyan sus estructuras, mostrando cada uno de ellos cinco señales correspondientes a otros tantos grupos carbonilo: cuatro de ellos son de los grupos acetatos y el quinto a desplazamiento más bajo (155.2 y 155.1 ppm, respectivamente), al carbonilo de urea. Se observan también los carbonos aromáticos y los seis correspondientes a la unidad de glucosamina (94.1-54.3 ppm), así como los originados por los 4 metilos de acetato y, en el compuesto **25**, los dos carbonos de los metilos presentes en el anillo fenilo.

Se han preparado otras dos ureas lipofílicas (Esquema 18) con la posibilidad de formación de dímeros por la utilización de diisocianatos en una proporción 2:1 de glucosamina acetilada/diisocianato.



Esquema 18. Reacción de 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-amino-2-desoxi-β-D-glucopiranososa con diisocianatos.

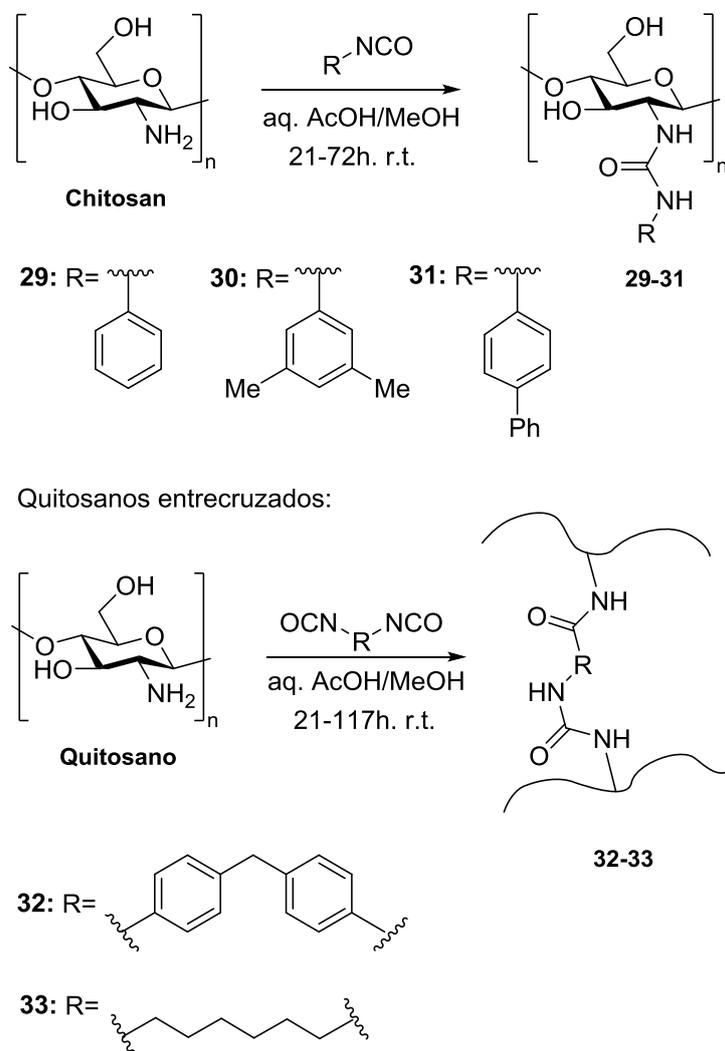
El espectro de IR del compuesto **27** no tiene cambios destacables con respecto al resto de compuestos. Sin embargo, de su espectro de ^1H RMN se puede deducir claramente su estructura. A 7.26 y 7.04 ppm se encuentran dos dobletes correspondientes a los protones de los grupos fenilo. También se observa un singulete para los dos protones del grupo CH_2 bencílico a 3.75 ppm. En todos los espectros de ^1H RMN obtenidos de las diferentes ureas, la señal del H-2 se superponía con la de H-6. Sin embargo, en este caso se aprecia claramente una señal a 3.91 ppm que aparece como un cuartete ($J = 9.5\text{Hz}$) correspondiente a H-2. La formación del cuartete

implica que las constantes de acoplamiento de los diferentes protones que se acoplan a éste son iguales, incluyendo el acoplamiento con H-1, H-3 y el protón del grupo ureidil formado.

En el espectro de ^1H RMN del compuesto **28** se observan multitud de detalles estructurales muy destacados: entre 1.46 y 1.25 ppm se aprecian un conjunto de picos que correspondientes a los grupos alifáticos del dímero, en la región de 3.21 y 3.04 ppm se observan dos multipletes que se asignan a dos protones del dímero. Ambos protones son diastereotópicos. Los diastereómeros o diastereoisómeros son estereoisómeros que no son imágenes especulares uno de otro. Esta característica podemos diferenciarla en RMN ya que ambos protones se encuentran sobre el mismo carbono, pero no son equivalentes por lo que dan lugar a desplazamientos químicos diferentes para los protones de un mismo átomo de carbono.

3.2.2 *Reacción de quitosano con isocianatos y diisocianatos.*

Las reacciones del quitosano con isocianatos y diisocianatos comerciales, se llevaron a cabo en una disolución de MeOH/H₂O 1:1, a temperatura ambiente, pH 6.2 ajustado con NaOH (4M), con una etapa previa de disolución del quitosano a pH 2.9, con tiempos de reacción de 21, 94, 72, 117 y 86 horas para la formación de los productos **29** a **33**, respectivamente (Esquema 19). Estos productos se han caracterizado utilizando FT-IR, ^1H RMN y los productos **30**, **32**, **33** mediante ^{13}C CPMAS RMN.



Esquema 19. Síntesis de las ureas derivadas de quitosano **29-33** por reacción de quitosano con isocianatos y diisocianatos comerciales.

3.2.3 Caracterización de las ureas derivadas de quitosano mediante FT-IR.

En los espectros de IR de los compuestos **29** a **33**, se observó la ausencia de la banda característica del isocianato a $2250\text{-}2280\text{ cm}^{-1}$. La banda de

tensión del N-H aparece ahora a 1575 cm^{-1} como resultado de la *N*-sustitución.¹¹⁰ Se observa la presencia de bandas características de los compuestos aromáticos entre $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ y entre $690\text{ y }850\text{ cm}^{-1}$, y las señales comunes del quitosano ($3350, 2870, 1375, 1150, 1020, \text{ y }890\text{ cm}^{-1}$) (Figura 30).

En el compuesto **33** (en rojo), se observan bandas de tensión similares a las descritas anteriormente, excepto las bandas aromáticas. Se observa también un pico a 2926 cm^{-1} por contribución de los grupos metileno presentes en dicho derivado de quitosano. Por último, la banda de tensión del carbonilo de la urea a 1650 cm^{-1} se solapa con la del carbonilo de la unidad de *N*-acetilglucosamina del quitosano,

En términos de quimioselectividad, se establece por FTIR que en todos los compuestos analizados (**29-33**) se ha dado la *N*-sustitución pues hay ausencia de la banda a 1700 cm^{-1} , que se observa en carbamatos.^{111,112}

¹¹⁰ Xu, C.; Wang, J.; Wang, M.; Dong, Y.; Wu, Y.; Ruan, Y. 2001. *Science in China. Series B: Chemistry*, **2001**, 44(2), 216-224.

¹¹¹ Welsh, E. R.; Schauer, C. L.; Qadri, S. B.; Price, R. R. **2002**, 1370–1374.

¹¹² <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C122429&Mask=80> (accesado en May 2, 2013).

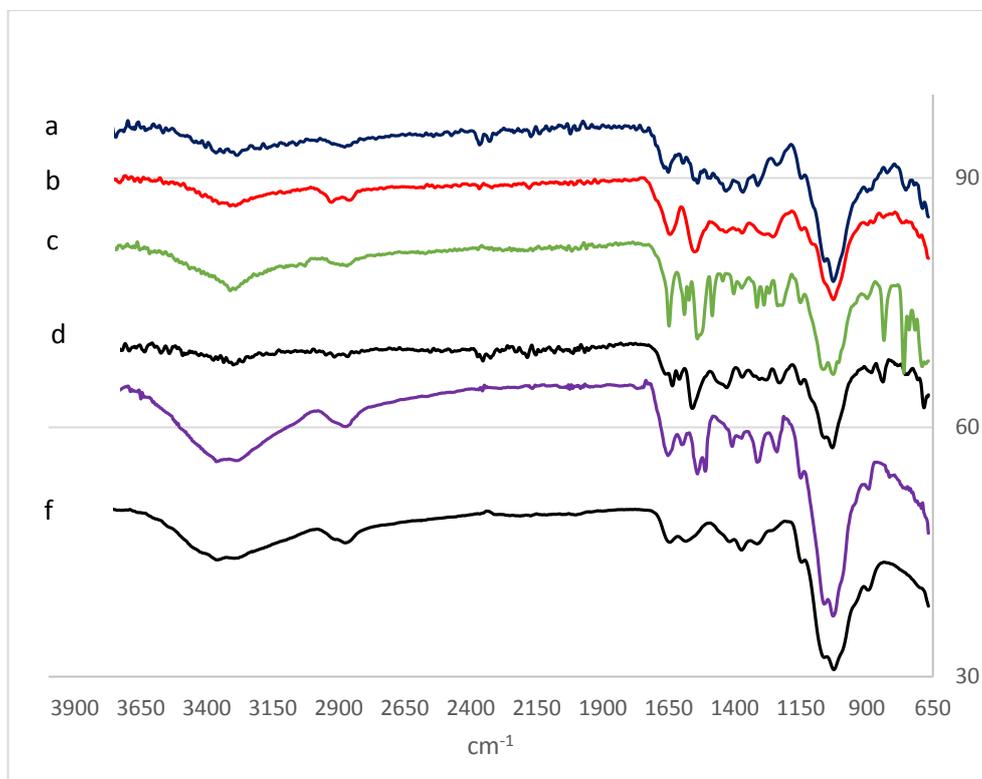


Figura 30. Espectro FT-IR de los compuestos 29 (a), 30 (b), 31 (c), 32(d), 33 (e) quitosano de partida (f).

Caracterización de las ureas derivadas de quitosano mediante ^1H RMN.

El espectro ^1H RMN del ureidil derivado de quitosano **29** se muestra en la Figura 31. En la región entre 7.35 ppm a 7.14 ppm, en la que se observan dos señales, aparecen los cinco protones aromáticos H2', H3', H4' del grupo fenilo. La relación de integrales de esas dos señales es de 4 a 1, siendo la señal más apantallada la que corresponde al protón H4'. Entre 4.92 y 3.23 ppm aparecen los protones del quitosano que corresponden al H-1_{GlcN} (4.92 ppm), la señal que aparece a 4.65 ppm se asigna a H-1_{GlcNH-CO-NH-Ar} y

H-1_{GlcNAc}, en la región entre 4.30-3.40 ppm aparecen los protones H3-H6, y la señal a 3.23 ppm corresponde al H2' del quitosano.

A efectos de determinar el DS de la urea **29**, se compara el espectro de ésta con el del quitosano de partida obtenido en las mismas condiciones (Figura 32) y se observa que mientras que las señales correspondientes a los H2 de ambos espectros se solapan perfectamente, la región del H3-H6 es más intensa para el ureidil derivado, aun cuando en esta región no hay señales que correspondan a la unidad fenilureido. Se deduce por tanto que el H2_{GlcNR} se desapantalla con respecto al H2_{GlcN}, y que se debe encontrar en la región donde aparecen H3-H6. A diferencia del H2_{GlcNR} observamos que el H1_{GlcNR} se apantalla con respecto al H1_{GlcN} y aparece solapado con la señal de H1_{GlcNAc} (4.65 ppm) en el que hay un incremento del área de esa región con el espectro del quitosano de partida (Figura 32).

En base a las consideraciones anteriores, el grado de sustitución (DS) debe ser determinado utilizando la ecuación (12).

$$\text{DS (mol\%)} = \left[\frac{I_{\text{Ar/n}}}{I_{(\text{H2-H6})/6}} \right] \times 100 \quad (12)$$

Así se obtiene para la reacción del quitosano con el isocianato de fenilo un grado de sustitución del 22.5%.

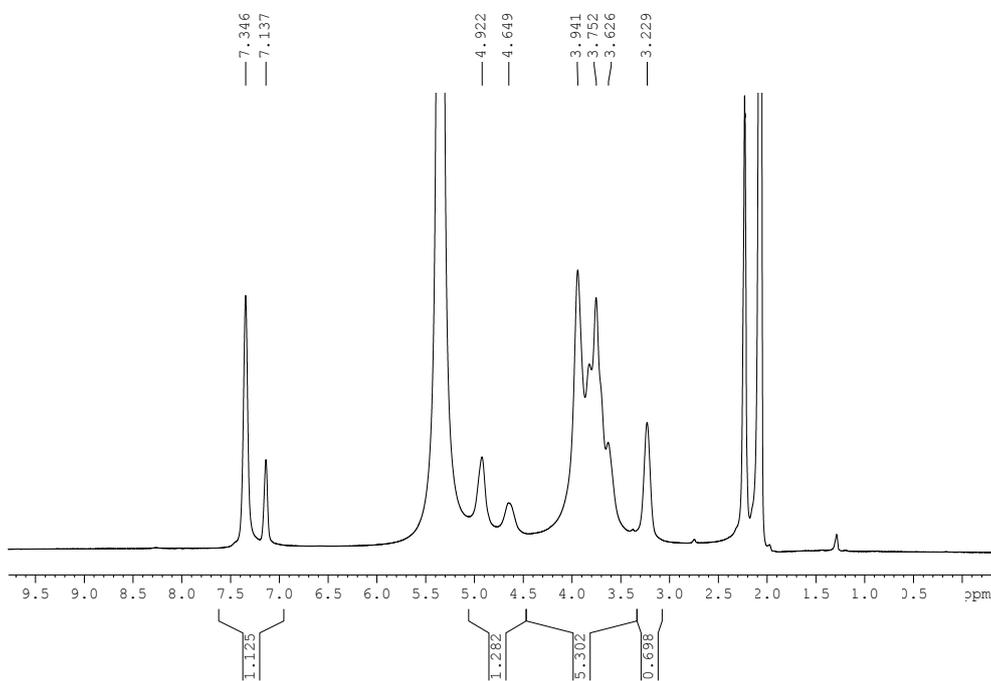


Figura 31. Espectro ^1H RMN del compuesto **29** en 20% CD_3COOD .

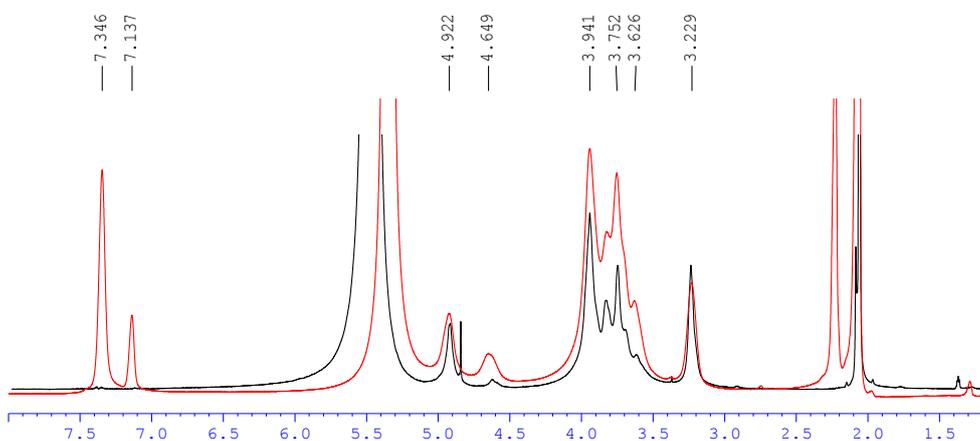


Figura 32. ^1H RMN del compuesto **29** (rojo) en comparación con el ^1H RMN del quitosano partida (negro).

Debido a la conocida reactividad de los isocianatos con grupos hidroxilos y grupos aminos,¹¹³ se propuso determinar la quimioselectividad en el proceso de formación del producto **29** para confirmar la *N*, la *O* o ambos tipo de sustituciones. A tal fin se realizó primeramente un ¹H-¹H COSY (Figura 33) que muestra como los protones que originan ambos grupos de señales en el compuesto **29** están acoplados, es decir pertenecen al mismo anillo de fenilo y a un mismo tipo de sustitución. En nuestras condiciones de reacción, MeOH/H₂O, 1.0 eq/mol del isocianato, a pH= 6.2 y, dado que la nucleofilia del grupo amino es mayor que la del hidroxilo primario el tipo de sustitución que debería darse en este caso es la *N*-sustitución.

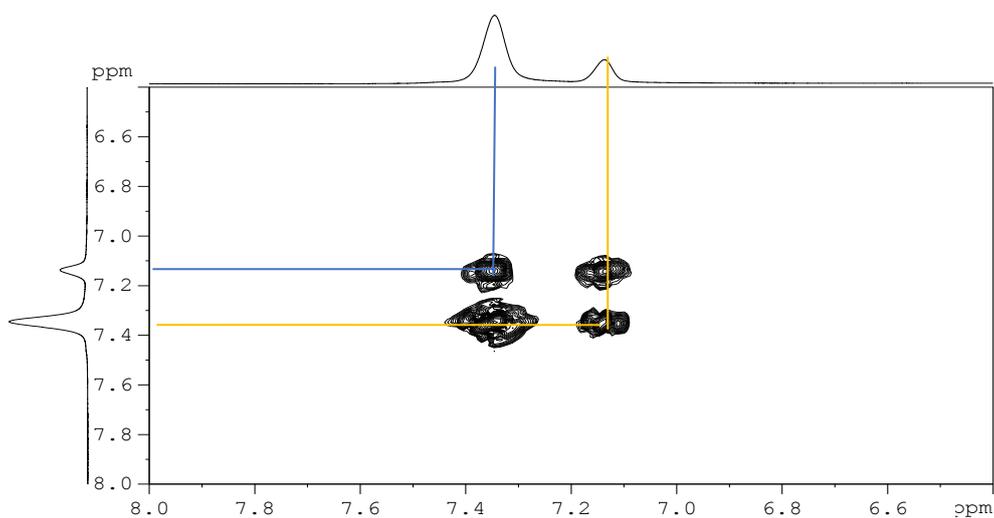


Figura 33. Espectro COSY del compuesto **29** en 20% CD₃COOD.

Nuestras condiciones de reacción son diferentes a las utilizadas por otros autores en las que se utilizan 0.1 M HCl a 50 °C,¹⁰¹ tolueno, Et₃N a temperatura ambiente por 24 horas¹⁰⁵ o en suspensión en DMSO con 7 equivalentes del isocianato respectivo. En este último caso, los autores

¹¹³ Wade, L. G. *Organic chemistry*. Englewood Cliffs, Prentice Hall International; NJ, 1999, p. 822.

describen derivados de quitosano persustituidos y solubles en MeOH y en DMSO, caso que no ocurrió para ninguno de nuestros ureidil derivados.

En la Figura 34 se muestra el espectro de la urea **30**, obtenida por reacción de quitosano y 3,5-dimetilfenil isocianato. A 6.96 y 6.78 ppm aparecen dos señales, asignadas como los protones H-2' y H-4', respectivamente, con una relación de integrales de 2 a 1. Entre 4.92 y 3.23 ppm aparecen los protones del quitosano, correspondiendo el más desapantallado al H-1_{GlcN}, a 4.64 ppm se asigna al H-1_{GlcNH-CONH-Ar} y H-1_{GlcNAc}. Luego aparece la región H3-H6 y a 3.23 ppm la señal que se asigna al H2_{GlcN}. Los metilos unidos directamente al anillo del fenilo generan una sola señal a 2.26 ppm.

Debido a la presencia de los dos metilos unidos a la unidad aromática se puede utilizar la ecuación (13) en adición a la ecuación (12) para el cálculo del DS.

$$\text{DS (mol\%)} = \left[\frac{I_{(\text{CH}_3)_2\text{Ar}}}{I_{(\text{H}2-\text{H}6)}} \right] \times 100 \quad (13)$$

De esta forma se obtiene un DS promediado de 20.5 % cercano al calculado para el *N*-(fenilcarbamoil) quitosano (**30**) mediante ¹H RMN (22.5%).

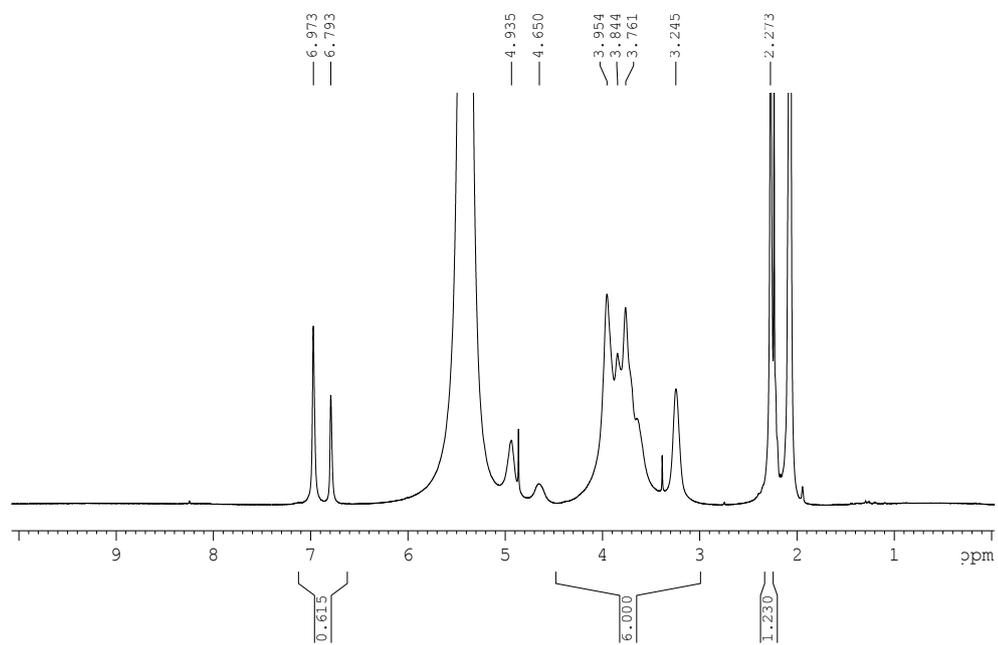
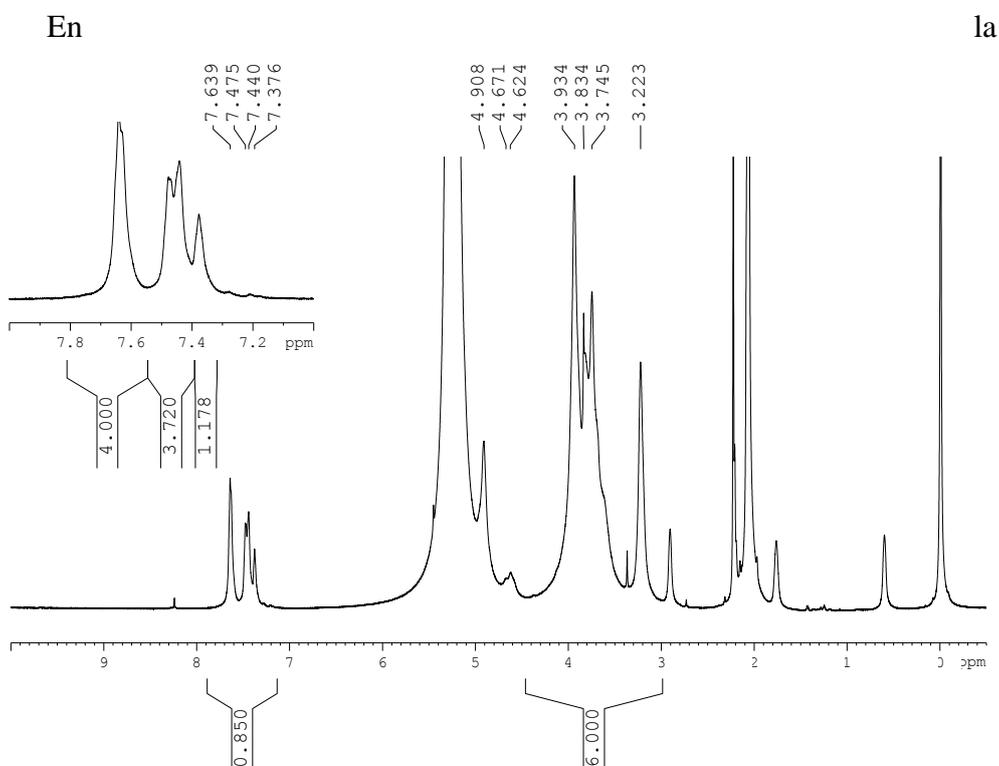


Figura 34. Espectro ^1H RMN del compuesto **30** en 20% CD_3COOD



se muestra el espectro de ^1H RMN del *N*-(bifenilcarbamoil) quitosano (**31**) que presenta las señales esperadas para este compuesto. A 7.64, 7.48, y 7.38 ppm aparecen los protones aromáticos H-2', H-2'', H-3', H3'', H-4'', respectivamente, cuya relación de integrales es de 4:4:1. Entre 4.91 y 3.22 ppm aparecen los protones del quitosano, siendo el H1_{GlcN} el que aparece más desapantallado, la señales a 4.67 y 4.62 se asignan a H1_{GlcNAc} y H1_{GlcNH-C₆O_{NH}-Ar} respectivamente, luego aparece la región 4.30-3.40 ppm correspondiente a los protones de H3-H6 y a 3.22 ppm la señal que se asigna al H2_{GlcN}.

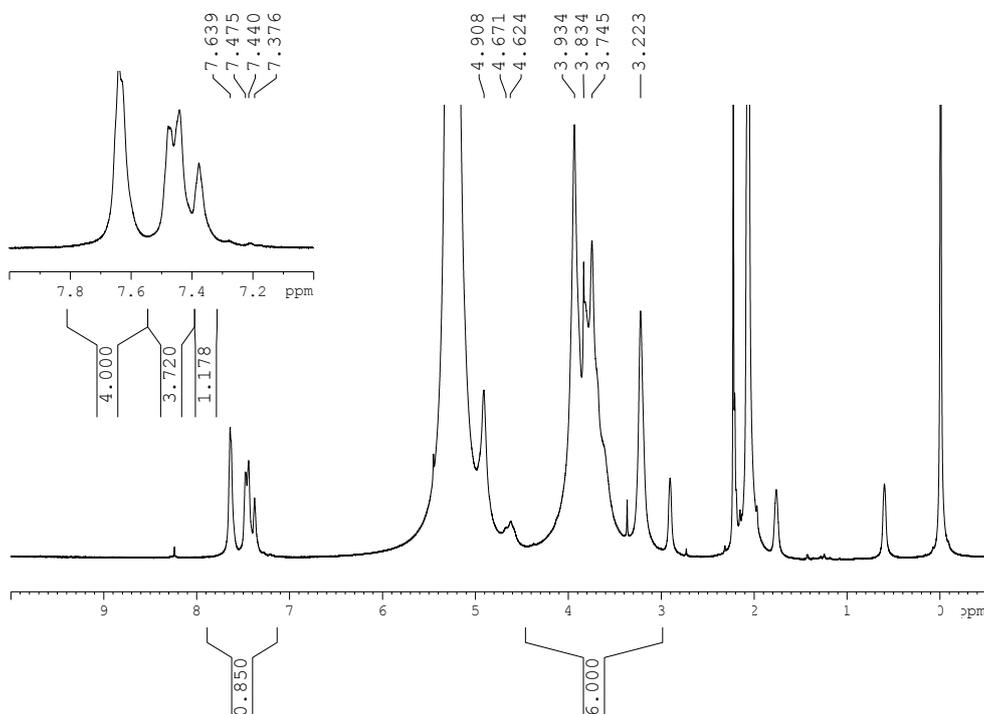


Figura 35. Espectro ^1H RMN en 20 % CD_3COOD del compuesto **31**.

El cálculo de la incorporación se realizó utilizando la ecuación (12), obteniéndose un DS de 9.6 %. A diferencia del compuesto *N*-(bifenilbencil)quitosano (**16**) obtenido por aminación reductiva del quitosano (Capítulo 2 de esta memoria), el producto **31** es soluble para realizarse su adquisición en ^1H RMN, sugiriéndose que la diferencia de DS en la amina (60%) comparado con 9.6 % en el compuesto **31** justifique la solubilidad de la urea..

El espectro de ^1H RMN del *N*-(bifenilmetilencarbamoil)- quitosano *N,N'*-Bis [(1→4)-2-desoxi-β-D-glucanil]-4,4'-dicarbamidodifenilmetano (**32**) presenta señales que demuestran la formación de este compuesto. A 7.31 y 7.18 ppm aparecen las señales correspondientes al H-2' y H-3' de la unidad difenilo respectivamente. Entre 4.93 (H-1_{GlcN}) y 3.24 ppm (H2_{GlcN}) se

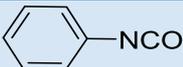
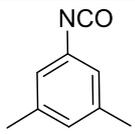
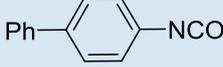
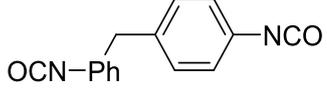
encuentran los protones del quitosano. La señal a 4.62 ppm se asigna al H-1_{GlcNH-C_{NH-Ar}}, H-1_{GlcNAc}, y la región del H3-H6 se encuentra a 3.94-3.40 ppm. En esta región también se encuentran los protones metileno –CH₂– de la unidad difenilmetano. A consecuencia del solapamiento de estos protones dentro de la región H3-H6 se empleó la ecuación (14) para el cálculo del DS, obteniéndose un valor de 5.6 %.

$$DS \text{ (mol\%)} = \left[\frac{I_{(Ar/n)}}{I_{(Ar/n)} + I_{H-2_{GlcN}}} \right] \times DD \quad (14)$$

Debido a la reacción de entrecruzamiento el producto fue muy viscoso al disolverlo en 20% CD₃COOD lo que generó señales muy anchas en su espectro de ¹H RMN. Este agente entrecruzante no se ha utilizado previamente para la reacción de entrecruzamiento del quitosano. La reacción del diisocianato de 1,6-hexametileno con quitosano origina un compuesto que por su insolubilidad, incluso en 50% CD₃COOD no puede ser estudiado mediante ¹H RMN en disolución. Por ello, la caracterización y cuantificación de este producto, al que se asigna la estructura **33**, se ha realizado utilizando ¹³C CPMAS RMN en estado sólido, como está descrito en la sección siguiente. El procedimiento sintético utilizado es diferente al propuesto por Gallego et al.,¹¹⁴ en la que se describe un producto soluble en DMSO, lo cual no fue así para nuestro producto, probablemente por el mayor DS obtenido en nuestro caso.

¹¹⁴ Gallego, R.; Arteaga, J.; Valencia C.; Franco, J. M. *Molecules*, **2013**, *18*, 6532-6549.

Tabla 9. Condiciones de reacción y DS (¹H RMN) obtenidos en las reacciones de isocianatos y diisocianatos comerciales con quitosano

Isocianato de partida (mol-equiv)	Condiciones de reacción ^a	Prod.	DS (mol%)	Rto. (%)
 (1.0)	MeOH/H ₂ O 21 h, pH 6.2, t.a.	29	22.5	92
 (1.16)	MeOH/H ₂ O 94 h, pH 6.2, t.a.	30	20.5	84
 (1.0)	MeOH/H ₂ O 72 h, pH 6.2, t.a.	31	9.6%	94
 (3.04)	MeOH/H ₂ O 117 h, pH 6.2, t.a.	32	5.6	85

^aEl quitosano fue tratado con el correspondiente isocianato con los equivalentes descritos en la tabla.

^bRendimiento (%) = $\text{Peso del quitosano } N\text{-sustituido (g)} \times [166.72 / (\text{peso del quitosano (g)} \times \text{FW calculado del GlcN } N\text{-sustituido})] \times 100$; $\text{FW del GlcN } N\text{-sustituido} = M_{w\text{Glc}} + \text{DS}_d \times (M_{w\text{Isocianato}})$
NS: no soluble.

En la **Tabla 9** se muestran las condiciones de reacción y los grados de sustitución (DS) de los derivados de quitosano obtenidos conteniendo una función urea mediante ¹H RMN en disolución. Se observa por tanto que el DS varía en la forma **29 ~ 30 > 31 > 32**.

3.2.4 Caracterización de las ureas derivadas de quitosano mediante ^{13}C CPMAS RMN en estado sólido.

El espectro de ^{13}C CPMAS RMN del *N*-(3,5-dimetilfenilcarbamoil)-quitosano (**30**) (Figura 36) confirma la estructura asignada al compuesto pues en él se observan las siguientes señales: una señal a 158.2 ppm que corresponde al carbonilo de la urea, entre 140.7 y 117.0 ppm aparecen las señales de los carbonos aromáticos, los carbonos del quitosano aparecen entre 104.5-59.1 ppm, en particular C1 a 104.5 ppm, C4 a 82.9, la señal a 75.3 ppm asignada a los C-3, C-4, C-5, y a 59.1 ppm la señal de C-6. La señal correspondiente a los dos grupos metilo unidos al anillo aromático aparecen a 23.4 ppm solapados con la señal del CH_3 de las unidades de *N*- COCH_3 del quitosano.

En cuanto a la cuantificación del grado de incorporación o grado de sustitución (DS) del compuesto **30** se observa en la Tabla 10 que la incorporación varía ligeramente dependiendo del tipo de carbono utilizado en los determinación. Para ello se comparó la integral del carbono/s respectivo/s (CR) con el C1 del quitosano empleando la ecuación (13) en la que n representa el número de carbonos utilizados para obtener la integral. Se obtiene así un valor promediado para el DS de 20.4 %.

$$\text{DS (mol\%)} = \left[\frac{I \text{ CR/n}}{I \text{ C-1}} \right] \times 100 \quad (13)$$

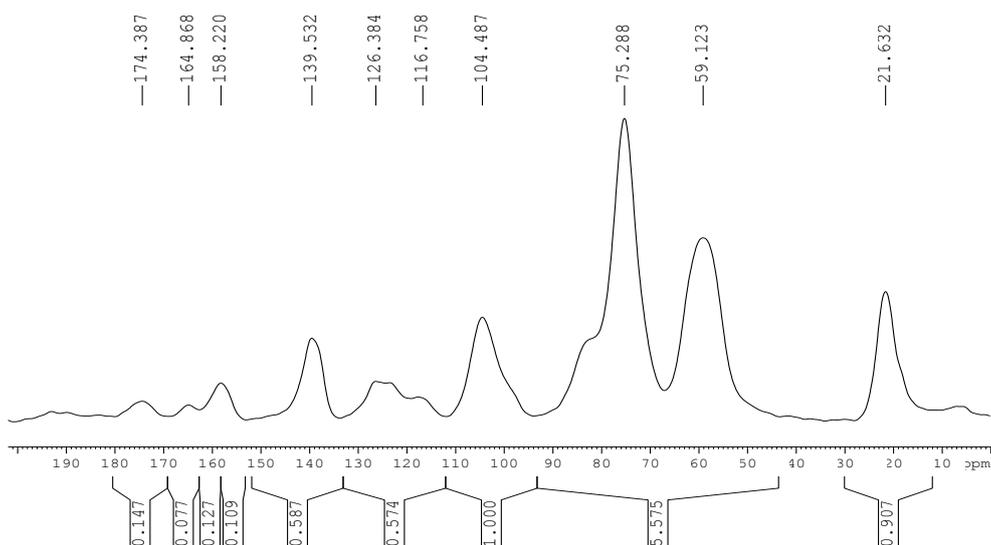


Figura 36. Espectro ^{13}C CPMAS RMN del compuesto **30** girado a 10 kHz.**Tabla 10.** Determinación del DS para el compuesto 30 mediante ^{13}C CP MAS RMN.

número de Carbonos	Integral	Velocidad (kHz)	DS (mol %)
6 (Ar)	1.161	10 kHz	19.4
7 (Ar y C_{urea})	1.473	10 kHz	21.0
2 (CH₃)	0.677 ^b	10 kHz	34.0
C_{urea}	0.218	10 kHz	21.8

^a Se incluyen los aromáticos y el carbonilo de la urea

^b Se obtiene al sustraer 0.23 de 0.907 por el solapamiento de la integral N-COCH₃.

En el espectro ^{13}C CPMAS RMN del compuesto **32**, obtenido por reacción del quitosano con el 4,4'-metilenbis(fenilisocianato) se observan señales pertenecientes a los dos carbonilos de la urea a 158.3 ppm, la región aromática de 12 carbonos con señales entre 137.4 y 118.1 ppm, las señales de C1 a 105.2 ppm y las correspondientes a los C2-C6 del quitosano entre 90 y 50 ppm, y el metileno a 40.7 ppm.

En el cálculo del DS se obtiene un 2.2 % si se utiliza la integral del carbonilo, un 2.9 % utilizando los carbonos aromáticos, y un 3.0 % al considerar la integral del metileno. Con la expresión del ecf, tipo $y = 1.64x + 1.07$, basado en la integral de los carbonos aromáticos, se calcularía una incorporación del 5.8 %, un valor muy cercano al 5.6 % que se obtuvo experimentalmente mediante ^1H RMN.

El producto obtenido en la reacción del 1,6-hexametilen diisocianato con quitosano, al que asignamos la estructura **33**, fue insoluble para realizar su caracterización y cuantificación del DS por ^1H RMN en disolución, por lo

que se recurrió exclusivamente al ^{13}C CPMAS RMN en estado sólido para su estudio.

En el espectro de ^{13}C CPMAS RMN de **33** (Figura 37) se observan las señales que confirman la estructura asignada a este compuesto. A 160.3 ppm aparece la señal correspondiente al carbonilo de la urea. Entre 103.9 a 55.0 se encuentran las señales de los carbonos del quitosano, siendo la señal mas desapantallada la correspondiente al C-1, a 82.9 ppm al C-4, la señal a 75.2 ppm asignada a C-3 y C-5, a 61.9 ppm la señal correspondiente al C-6 y a 59.9 ppm al C-2. Debido a la presencia de 2 grupos isocianatos en el 1,6-hexametilendisocianato, puede ocurrir el entrecruzamiento del quitosano que se reflejaría en una simetría en los valores de los desplazamientos de los carbonos alifáticos como se observa en la Figura 37 en el cual hay un solo pico a 41.4 ppm que se asigna a los carbonos alifáticos unidos al nitrógeno de la urea y dos señales, una a 30.6 ppm y otra a 27.9 ppm que corresponden al resto de carbonos alifáticos. No hay evidencia de grupos isocianatos que no hayan entrecruzado el quitosano por la observación de una sola señal del carbono de la urea y que por tanto no reflejaría la presencia del carbamato. Por último la señal a 23.4 ppm se asigna al N-COCH_3 .

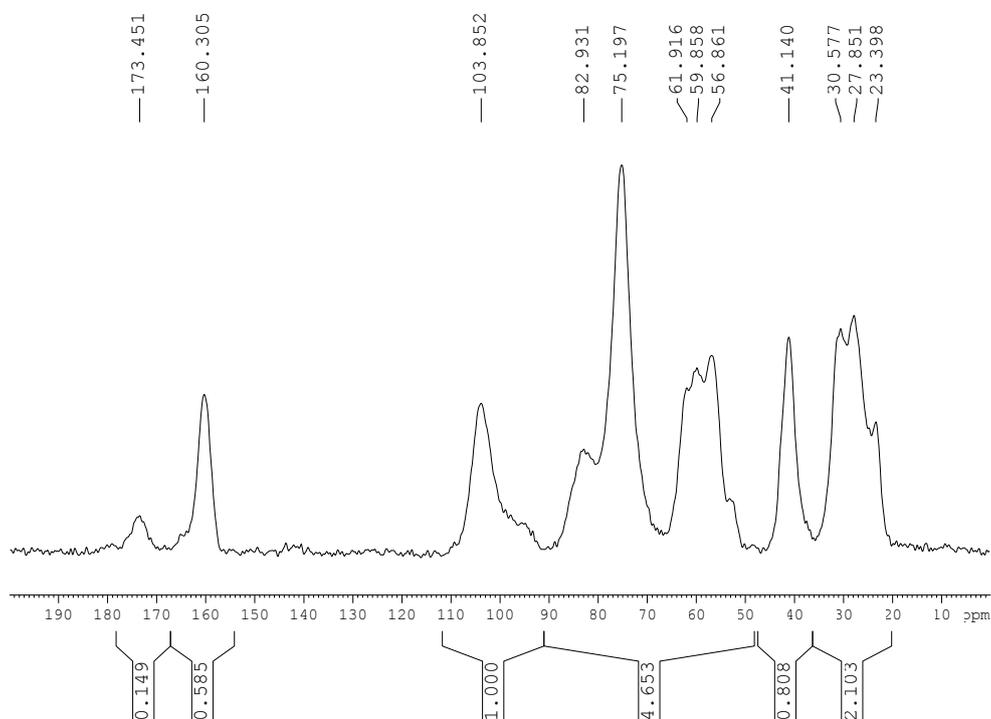


Figura 37. Espectro ^{13}C CPMAS RMN del compuesto **33** girado a 10 kHz.

El de DS varía dependiendo del grupo de carbonos utilizados para su cuantificación. Utilizando para ello la ecuación (13) se obtiene una incorporación del 29.2 % utilizando los carbonilos de la urea, 40.4 % al utilizar los carbonos extremos de la cadena alifática y 46.8 % utilizando el resto de C alifáticos. El carbonilo de la urea se encuentra en un entorno deficiente de protones lo que explica que sea se obtenga el menor DS al considera la integral del carbonilo para el DS, mientras que los carbonos en la cadena alifática se encuentran en un entorno rico en protones (Ver también discusión al respecto en Capítulo 2). Tomando en cuenta los entornos ricos y deficientes en electrones podemos obtener un valor de DS promedio de 36.4 %.

En la Tabla 11 se muestran los grados de sustitución de los derivados, de tal forma que el DS varía en la forma 33 > 30 > 32

Tabla 11. Derivados urea de quitosano. Análisis por ^{13}C CPMAS RMN.

Derivado de Quitosano ^a	Carbonilo Urea (C_{urea}) (ppm)	N-sustitución (DS) (mol %) ^b
30	158.2	19.4 ^c
		29.8 ^d
32	158.3	2.9 ^c
		2.2 ^e
33	160.3	29.2 ^e
		43.6 ^f

^a Todos los derivados urea de quitosano fueron sintetizados in MeOH/H₂O, 21 -117 h, pH 6.2, t.a

^b Cuantificado por ^{13}C CPMAS NMR utilizando la ecuación 13. Empleando ecuación 13, ^cCR= Ar, ^dCR= (CH₃)₂, ^eCR= C_{urea}, ^fCR= C_{alif}

**CAPITULO 4. FORMACIÓN DE
DERIVADOS DE QUITOSANO
CUATERNIZADOS**

5.1 Antecedentes

La aplicación del quitosano está limitada debido a su pobre solubilidad a pH fisiológico, lo que a su vez disminuye la eficiencia de la administración de fármacos por encima de pH 6. Las estrategias para aumentar la solubilidad del quitosano a pH neutro consisten en introducir cargas permanentes en el esqueleto de quitosano. Para obtener derivados hidrosolubles de quitosano, se han preparado quitosanos cuaternizados por metilación, quitosanos carboximetilados y quitosanos sulfonados.¹¹⁵

Además, algunas de las propiedades importantes del quitosano (antimicrobiana, mucoadhesiva, absorción, solubilidad) se basan en la presencia de cargas positivas en su estructura. Estas aplicaciones están limitadas por su pK_a y por tanto, restringen la efectividad del quitosano hasta un pH máximo de 6.0-6.2.

La cuaternización es una de las estrategias más útiles para obtener quitosanos o derivados de quitosano solubles, tanto en H_2O como en un rango más amplio de pH, incluyendo el fisiológico. Se basa en la introducción de cargas positivas permanentes ya sea por alquilación directa de los grupos aminos del quitosano o acoplado a su esqueleto sustituyentes con grupos aminos cuaternizados. Se ha realizado la cuaternización en diferentes condiciones y con diferentes reactivos, siendo los más comunes el yoduro de metilo, *N*-metil-2-pirrolidona (NMP) y NaOH ac para obtener el

¹¹⁵ Patrúlea, V.; Applegate, L. A.; Ostafe, V.; Jordan, O.; Borchard, G. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *122*, 46–52.

N,N,N-trimetilquitosano (TMC)^{115,116} y el cloruro de trimetilglicidilamonio (GTMAC) para obtener el cloruro de *N*-[(2-hidroxi-3-trimetilamonio)propil]quitosano (HTTC).^{117,118}

Domard et al.¹¹⁹ prepararon TMC haciendo reaccionar CH₃I con quitosano suspendido en NMP y yoduro de sodio durante 3h. Con la utilización de una resina de intercambio iónico (Amberlita IR 45) se obtuvo el TMC con el contraión cloruro, lográndose la solubilidad de este compuesto en agua, independientemente del pH, a partir de grados de cuaternización (DQ) mayores a 25%. Entre los inconvenientes o dificultades del procedimiento de síntesis del TMC están: 1) el hecho de que sólo los grupos aminos del quitosano modificados estén permetilados, 2) obtención de compuestos con pesos moleculares reducidos atribuibles a escisión de la cadena, 3) la *O*-metilación puede ocurrir, conduciendo a valores altos y/o incontrolados de DQ y consiguientemente cambios en las propiedades del polímero. Muzzarelli y Tanfani¹²⁰ realizaron la primera *N*-permetilación del quitosano, para obtener el TMC evitando la *O*-metilación. En una primera etapa hacían reaccionar el quitosano con formaldehído y posterior reducción con borohidruro de sodio, obteniendo *N,N*-dimetilquitosano (DMC). En una segunda etapa, hacían reaccionar el DMC formado con CH₃I, en acetonitrilo a 35 °C, durante 30 horas, para dar un producto con un DQ de 60%, pero insoluble en H₂O. El mismo principio ha sido empleado por otros autores

¹¹⁶ Martins, A. F.; Bueno, P. V. A.; Follmann, H. D. M.; Nocchi, S. R.; Nakamura, C. V.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *Carbohydr. Res.* **2013**, *381*, 153–160.

¹¹⁷ Faizuloev, E.; Marova, A.; Nikonova, A.; Volkova, I.; Gorshkova, M.; Izumrudov, V. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *89*, 1088-1094.

¹¹⁸ Sowmya, A.; Meenakshi, S. *J. Environ. Chem. Eng.* **2013**, *1*, 906–915.

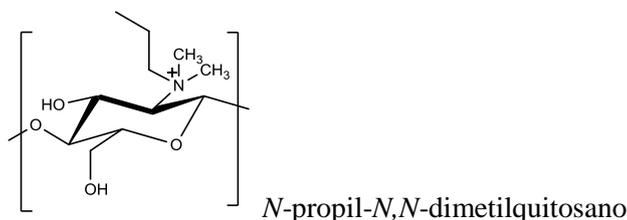
¹¹⁹ Domard, A.; Rinaudo, M.; Terrassin, C. *Int. J. Biol. Macromol.* **1986**, *8*, 105-107.

¹²⁰ Muzzarelli, R. A. A.; Tanfani, F. *Carbohydr. Polym.* **1985**, *5*, 297–307.

realizando la cuaternización en dos etapas:¹²¹ la primera, es una modificación del procedimiento original de Muzzarelli usando formaldehído y ácido fórmico en lugar de borohidruro de sodio, para formar el DMC y la segunda etapa en la que el producto formado reacciona con CH₃I y NMP sin la presencia de un catalizador básico.

De Britto y Assis¹²² describen una variación en el procedimiento de obtención del TMC usando sulfato de dimetilo, más barato, como agente metilante, aunque con esta alternativa ocurre también simultáneamente la *O*-metilación. Runnarson et al.¹²³ utilizaron una mezcla de *N,N*-dimetilformamida/H₂O en lugar de NMP, disminuyendo la *O*-metilación, pero obteniéndose TMC junto con productos *N*-mono y dimetilados.

También se han obtenido otros quitosanos cuaternizados alquilando directamente el grupo amino del polímero, como los derivados de la familia *N*-alquil-*N,N*-dimetilquitosano (p. ej. *N*-propil-*N,N*-dimetilquitosano, *N*-hexil-*N,N*-dimetilquitosano).¹²⁴



¹²¹ (a) Belalia, R.; Grelier, S.; Benaissa, M.; Coma, V. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1582–1588. (b) Verheul, R. J.; Amidi, M.; Van der Wal, S.; Van Riet, E.; Jiskoot, W.; Hennink, W. E. *Biomaterials*, **2008**, *29*, 3642–3649. (c) Xu, T.; Xin, M.; Li, M.; Huang, H.; Zhou, S. *Carbohydr Polym*, **2010**, *81*, 931–936.

¹²² De Britto, D.; Assis, O. B. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *69*, 305–310.

¹²³ Runarsoon, O. V.; Holappa, J.; Nevalainen, T.; Hjalmsdottir, M.; Jarvinen, T.; Loftsson, T.; Einarsson, J. M.; Jonsdottir, S.; Valdimarsdottir, M.; Masson, M. *Eur Polym.* **2007**, *43*, 2660–2671

¹²⁴ Benediktsdóttir, B. E.; Gawarea, V. S.; Runarsson, O. V.; Jonsdottir, S.; Jensen, K. J.; Masson, M. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *86*, 1451–1460.

Otra alternativa de cuaternización ha sido la reacción del quitosano con una molécula previamente cuaternizada, como el cloruro de *N*-(3-cloro-2-hidroxipropil)trimetilamonio (QUAT188) o el GTMAC.

La reacción del GTMAC y quitosano consiste en la apertura del epóxido por los grupos nucleófilos del polímero. Se ha descrito en medio básico, la obtención de productos *N,O*-sustituídos a partir de quitosano y algunos aril derivados de este polímero, según indican los autores, a través del ataque del nucleófilo al carbono menos sustituido del epóxido.^{88,125} En medio neutro o en medio ácido se obtienen solamente los productos *N*-sustituídos, y de manera regioselectiva por ataque del nitrógeno nucleófilo sobre el carbono menos sustituido,^{126,127} si bien en ningún caso los autores aportan pruebas concluyentes que confirmen la regioselectividad observada. En general, las condiciones de reacción descritas para obtener este tipo de derivados *N*-sustituídos son mucho más simples y suaves que utilizando otras metodologías (p. ej. en la preparación de TMC), ya que se obtienen los productos cuaternizados en H₂O a 60 °C,¹²⁶ sin ningún tipo de catálisis. La *N*-cuaternización con GTMAC también se ha hecho con derivados de quitosano como el *O*-carboximetilquitosano, obteniéndose un producto cuaternizado con actividad antimicrobiana que se combina fácilmente con Ca²⁺, lo que incrementa afinidad por el Ca(OH)₂ de fuentes externas, lo que lo hace aplicable como recubrimiento pulpar pues induce la reparación de la dentina,¹²⁸ y como ya se ha mencionado en aminas

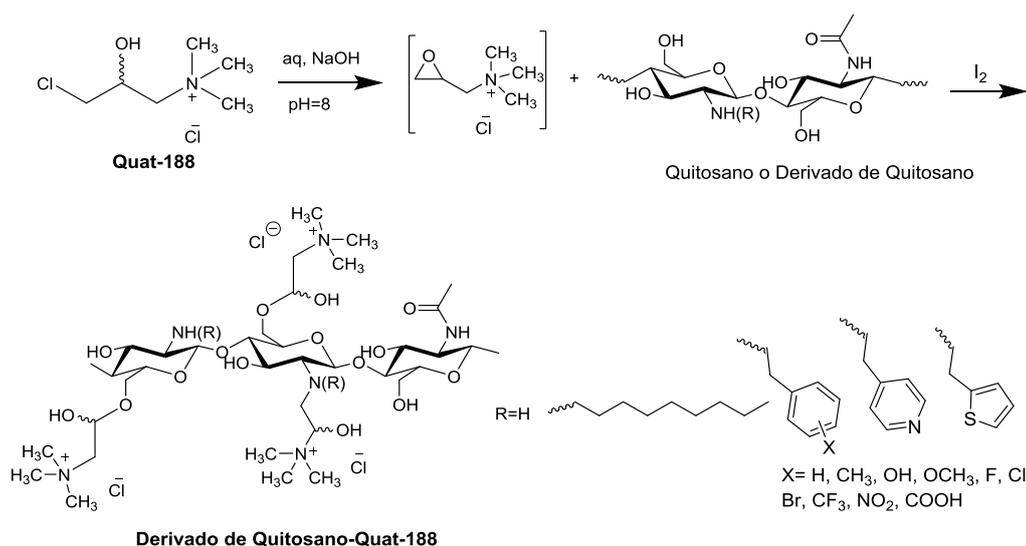
¹²⁵ Gruškienė, R.; Deveikytė, R.; Makuška, R. *Chemija* **2013**, *24*, 325–334.

¹²⁶ Ruihua, H.; Bingchao, Y.; Zheng, D.; Wang, B. *J. Mater. Sci.* **2012**, *47*, 845–851.

¹²⁷ Loubaki, E.; Ourevitch, M.; Sicsic, S. *Eur. Pol. J.* **1991**, *27*, 311–317.

¹²⁸ Sun, L.; Du, Y.; Fan, L.; Chen, X.; Yang, J. *Int J. Biol. Macromolec.* **2013**, *60*, 156–164.

secundarias de quitosano unidas a anillos aromáticos (Esquema 20)¹⁴ obteniéndose productos con aplicación como agentes antimicrobianos.



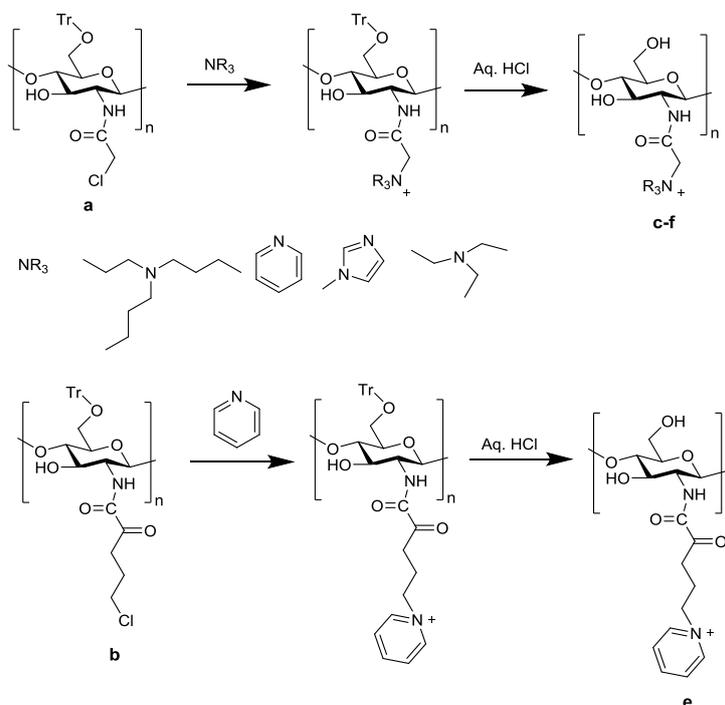
Esquema 20. Síntesis de quitosano cuaternizado y derivados de quitosano *N*-aril cuaternizados.⁸⁴

Se han descrito otras formas de cuaternización del quitosano Así, Holappa et al.¹²⁹ sintetizaron *N*-betainatos de quitosano con distintos valores de DS. La ruta sintética empleada por estos autores con el fin de evitar la O-sustitución, incluye la protección inicial del grupo amino como ftalimido Holappa ha descrito la cuaternización del quitosano vía *N*-cloroacil-6-trifenilmetilquitosanos y empleando varias aminas terciarias,¹³⁰ (**¡Error! No**

¹²⁹ Holappa, J.; Nevalainen, T.; Savolainen, J.; Soini, P.; Elomaa, M.; Safin, R.; Suvanto, S.; Pakkaenen, T. Masson, M.; Loftsson, T.; Jarvinen, T. *Macromolecules* **2004**, *37*, 2784-2789.

¹³⁰ Holappa, J.; Nevalainen, T.; Soininen, P.; Jarvinen, T. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 407-410.

e encuentra el origen de la referencia.) aplicando una estrategia relacionada con la ya mencionada.



Esquema 21. Ruta sintética para la preparación de varios derivados de quitosano cuaternarios vía *N*-cloroacil-6-trifenilmetilquitosanos (a y b).¹³¹

También la piperazina ha sido utilizada por este autor en la cuaternización del quitosano, en el que las unidades cuaternarias de amonio pueden insertarse en uno o en ambos nitrógenos del sustituyente, dando lugar a estructuras uniformes de derivados de quitosano.¹³¹

Entre algunas de las aplicaciones o mejoras aportadas por la cuaternización del quitosano o de derivados de quitosano tenemos: vectores

¹³¹ Holappa, J.; Nevalainen, T.; Savolainen, J.; Soini, P.; Asplund, T.; Luttkhedde, T.; Masson, M.; Jarvinen, T. *Macromol Biosci.* **2006**, *6*, 139-144.

de administración de genes en células epiteliales,¹³² agentes antimicrobianos,^{121c} formación de films,¹³³ retención de la humedad (cosmética),¹³⁴ mejora de la permeabilidad de la superficie de mucosas,¹³⁵ entre otras.

Examinando estos antecedentes y tomando en consideración que nuestro objetivo general de aprovechamiento de residuos de cangrejo requiere la búsqueda de estrategias económicas para la obtención materiales útiles, en nuestro caso, derivados de quitosano, estimamos que la obtención de derivados de quitosano cuaternizados por reacción con el GTMAC es la ruta más conveniente. Esto se debe a varios factores: 1) las condiciones suaves en que se obtienen aquí los productos cuaternizados no despolimerizan al quitosano, 2) se pueden ajustar las condiciones de reacción para obtener productos exclusivamente *N*-sustituídos, 3) sólo se requiere una etapa para su obtención y 4) se preserva la capacidad de protonación de los grupos amino, ahora secundarios, del biopolímero.

5.2 Resultados y Discusión

5.2.1 Cuaternización de quitosano y derivados de quitosano con cloruro de glicidiltrimetilamonio (GTMAC).

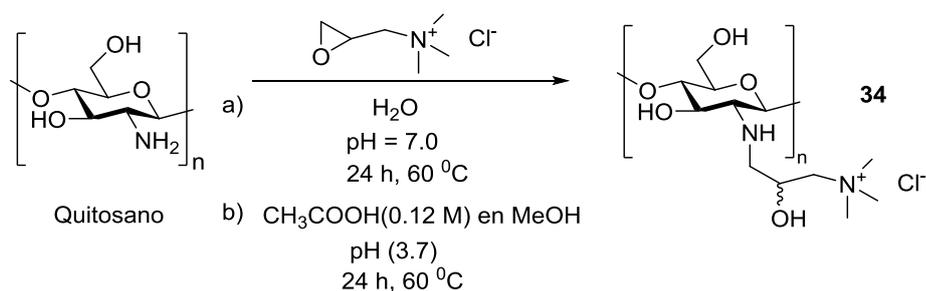
¹³² Thanou, M.; Florea, B. I.; Geldof, M.; Junginger, H. E.; Borchard, G. *Biomaterials* **2002**, *23*, 153–159.

¹³³ De Britto, D.; Assis, O. B. *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, *41*, 198-203.

¹³⁴ Huang, J.; Cheng, Z. H.; Xie, H.; Gong, JY.; Lou, J.; Ge, Q.; Wang, YJ.; Wua, YF.; Liua, SW.; Sun, PL.; Mao, JW. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *70*, 545–550.

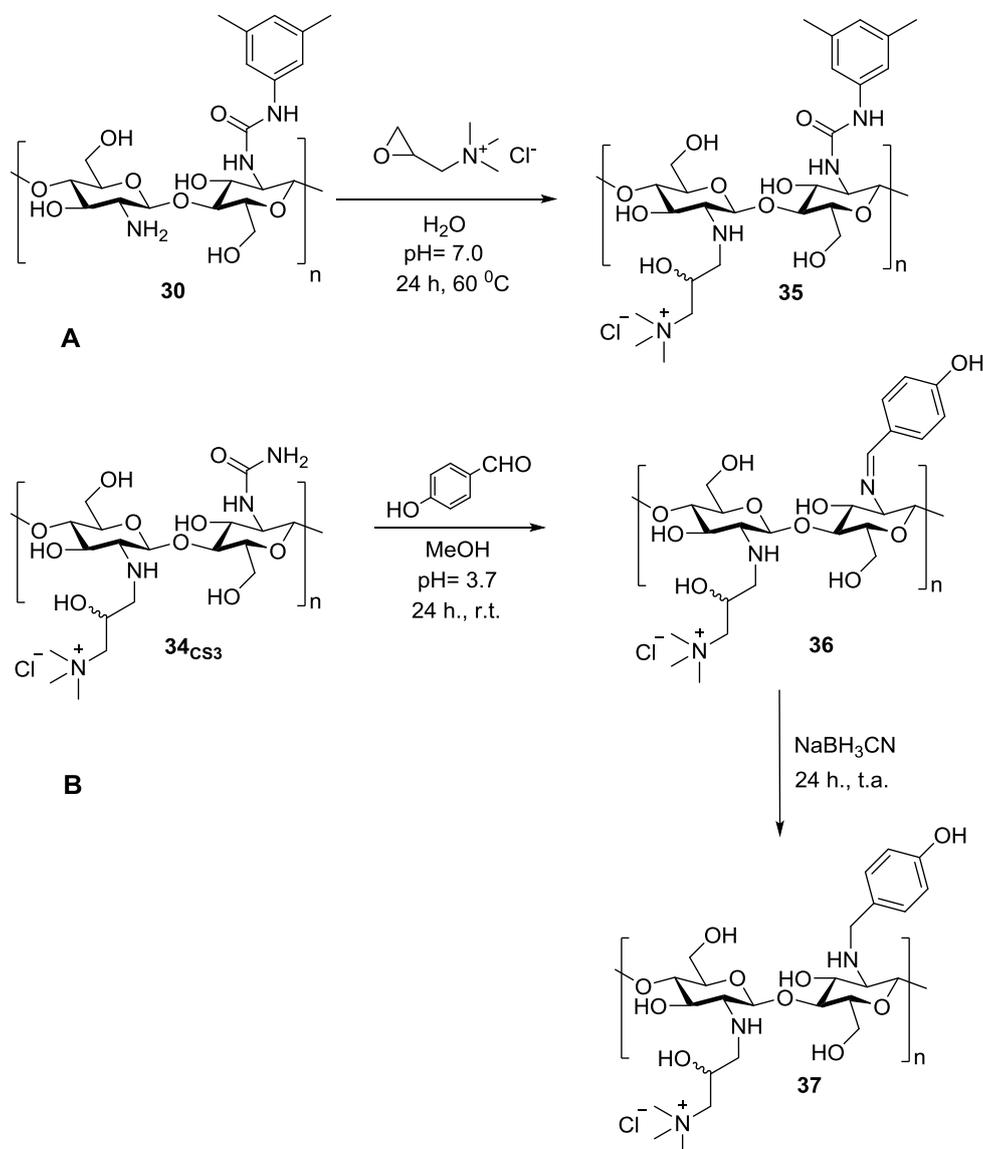
¹³⁵ Benediktsdottir, B. E.; Baldursson, O.; Masson, M. *J. Control Release* **2014**, *173*, 18–31.

En el Esquema 22 se presenta la formación de los quitosanos *N*-cuaternizados **34**_{CS4} y **34**_{CS3}, en H₂O (a) y en MeOH (b) respectivamente, ambos en suspensión a 60 °C durante 24 horas, empleando 6.0 y 3.5 mol-eq de cloruro de glicidiltetrametilamonio (GTMAC) y a un pH de 7.0 y 3.5, respectivamente.



Esquema 22. Formación de los quitosanos cuaternizados **34**, mediante reacción de los quitosanos **CS4** (a) y **CS3** (b) con GTMAC.

La cuaternización de los derivados de quitosano se realizó de dos formas distintas, como se muestra en el Esquema 23. Para la formación del derivado **35** se partió de la urea *N*-(3,5-dimetilfenilcarbamoil)quitosano (**30**) y ésta se cuaternizó en suspensión acuosa utilizando las mismas condiciones de reacción que para la formación del cloruro de *N*-[(2-hidroxi-3-trimetilamonio)propil] quitosano **34**_{CS4}.



Esquema 23. Formación del derivado de quitosano cuaternizado **35** a partir del ureidil derivado **30** (A). Formación de la imina **36** y la amina secundaria cuaternizada **37** (B).

En la síntesis de la imina cuaternizada **36** se partió del quitosano cuaternizado **34_{CS3}**, el cual se trató con 4-hidroxibenzaldehído, en una suspensión metanólica de CH_3COOH 0.12 M a un pH de 3.7. En la

formación de la amina derivada de quitosano **37** se partió del compuesto **34**_{CS3}, y tras la formación del producto **36** en las condiciones anteriores, se procedió a la etapa de reducción utilizando NaBH₃CN.

5.2.2 Caracterización de los derivados cuaternizados mediante FT-IR.

Tomando como referencia los quitosanos de partida, las señales más relevantes que confirman la formación de los correspondientes quitosanos cuaternizados son: 1) disminución de la intensidad de la señal asociada a la flexión de N-H amina primaria (1588 cm⁻¹) [(Figura 38) (x)]. y la aparición de una nueva señal a 1558 cm⁻¹ como consecuencia del cambio parcial de la amina primaria del quitosano a amina secundaria. 2) La aparición de una banda a 1476 cm⁻¹, correspondiente a la flexión simétrica de los C-H de los grupos metilo sustituyente del amonio cuaternario [(Figura 38) (y)]. Además, se observa una banda de tensión de OH más pronunciada a 3400 cm⁻¹ que en el quitosano de partida [(Figura 38) (z)] debido al número adicional de grupos hidroxilos, resultado de la apertura del cloruro de glicidil trimetilamonio.^{136,137}

El ureidil derivado cuaternizado **35** presenta una señal a 1473 cm⁻¹ correspondiente a los grupos metilo del amonio, la banda a 1560 cm⁻¹ debida a la flexión del N-H de la amina secundaria H, además de la banda de tensión del carbonilo de la urea (1648 cm⁻¹) (podría estar solapada con la correspondiente a las unidades de glucosamina del quitosano), y las bandas

¹³⁶ Zhao, S.; Wu, X.; Guo, W.; Du, Y.; Yu, L.; Tang, J. *Int. J. Pharmaceutics* **2010**, *393*, 268–272.

¹³⁷ Peng, Z.; Wang, L.; Du, L.; Guo, S.; Wang, X.; Tang, T. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *81*, 275–283.

a 1560 cm^{-1} , y a 837 y 740 cm^{-1} que pueden asignarse a la tensión del dobles enlaces C-C y flexión fuera del plano del anillo aromático del grupo dimetilfenilo.

Los espectros IR de los derivados de quitosano **36** y **37** presentan a 1475 cm^{-1} la banda que confirma la cuaternización en dichos productos correspondiente a la flexión simétrica de los C-H de los grupos metilo sustituyente del amonio cuaternario.

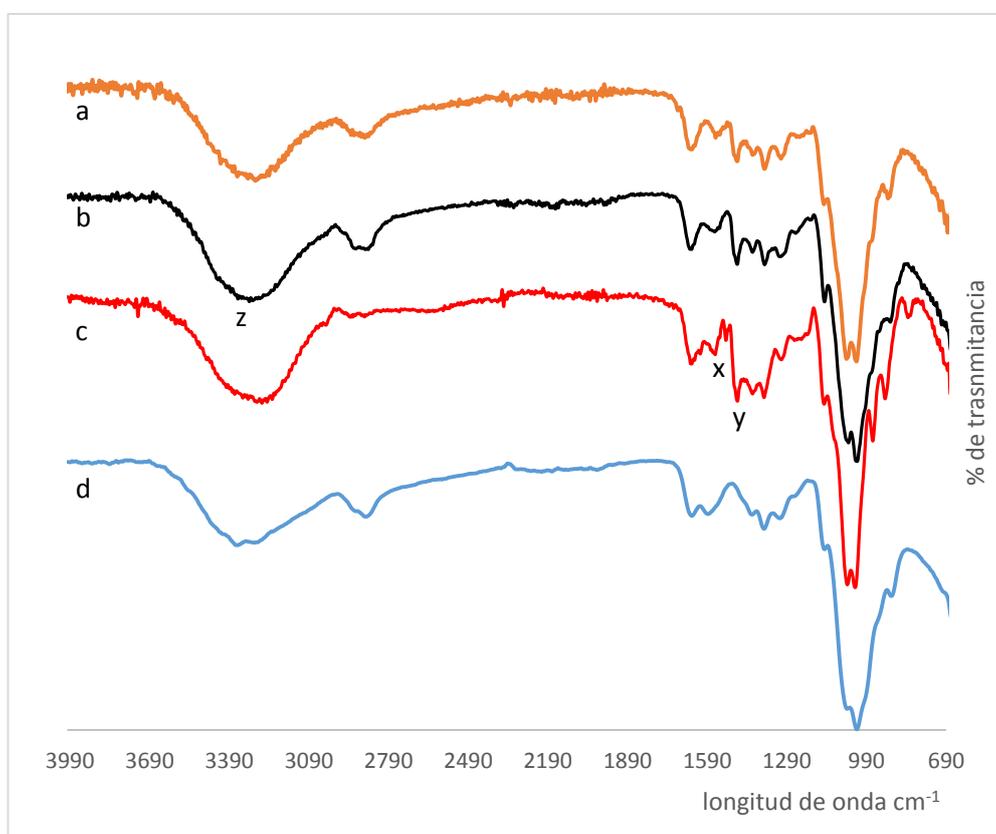


Figura 38. Espectro FTIR del producto 34_{CS4} sintetizado en medio neutro (a), medio ácido (b), del producto **37** (c) y del quitosano de partida CS3 (d).

5.2.3 Caracterización de los derivados cuaternizados de quitosano mediante ^1H RMN.

La adquisición de los espectros del compuesto **34**_{CS4}, resultado de la reacción entre quitosano **CS4** y GTMAC se realizó en D₂O, 0.16% DCl y en 20% CD₃COOD (Figura 39).

La asignación de las señales para el quitosano cuaternizado en condiciones similares a nuestro procedimiento se ha hecho previamente en D₂O.^{84,127,137,138} La señal intensa que aparece a 3.23 ppm (e) se asigna a los protones del N⁺(CH₃)₃, la señal a 4.32 ppm (b) se asigna al protón del metino unido al grupo hidroxilo, que aparece como resultado de la apertura del epóxido por ataque del nitrógeno nucleófilo al carbono menos sustituido. La señal para dos hidrógenos a 3.43 ppm (d) corresponde al metileno unido al nitrógeno cuaternario, y en la región comprendida entre 4.1 a 3.0 ppm (c) están los H3-H6. Debido a las discrepancias en las asignaciones para el H-2 y los metilenos de la unidad (2-hidroxi-3-trimetilamonio)propilo, estas señales se asignaron a partir de la información proporcionada por el 2D ^1H - ^1H COSY en D₂O (Figura 39). Las correlaciones obtenidas en el experimento ^1H - ^1H COSY son similares a la que describen Loubaki et al.,¹²⁷ los cuales asignan las señales de una muestra de quitosano cuaternizado con un DQ de 95%. Nosotros asignamos la señal que aparece a 2.56 ppm (g) al protón H-2 ya que ésta muestra correlación con H-1 y H-3, y la señal a 2.90 ppm (f) se asigna al metileno unido al grupo amino del quitosano (NH-CH₂) ya que se observa en el COSY correlación de ésta con la señal del metino a 4.32 (b), la cual, además, se correlaciona con la observada a 3.43 ppm (d), lo que

¹³⁸ Lim, S.; Hudson, S. *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, 313–319.

confirma la asignación realizada de esta última al metileno unido al nitrógeno cuaternario, es decir $-CH_2-N^+(CH_3)_3$.

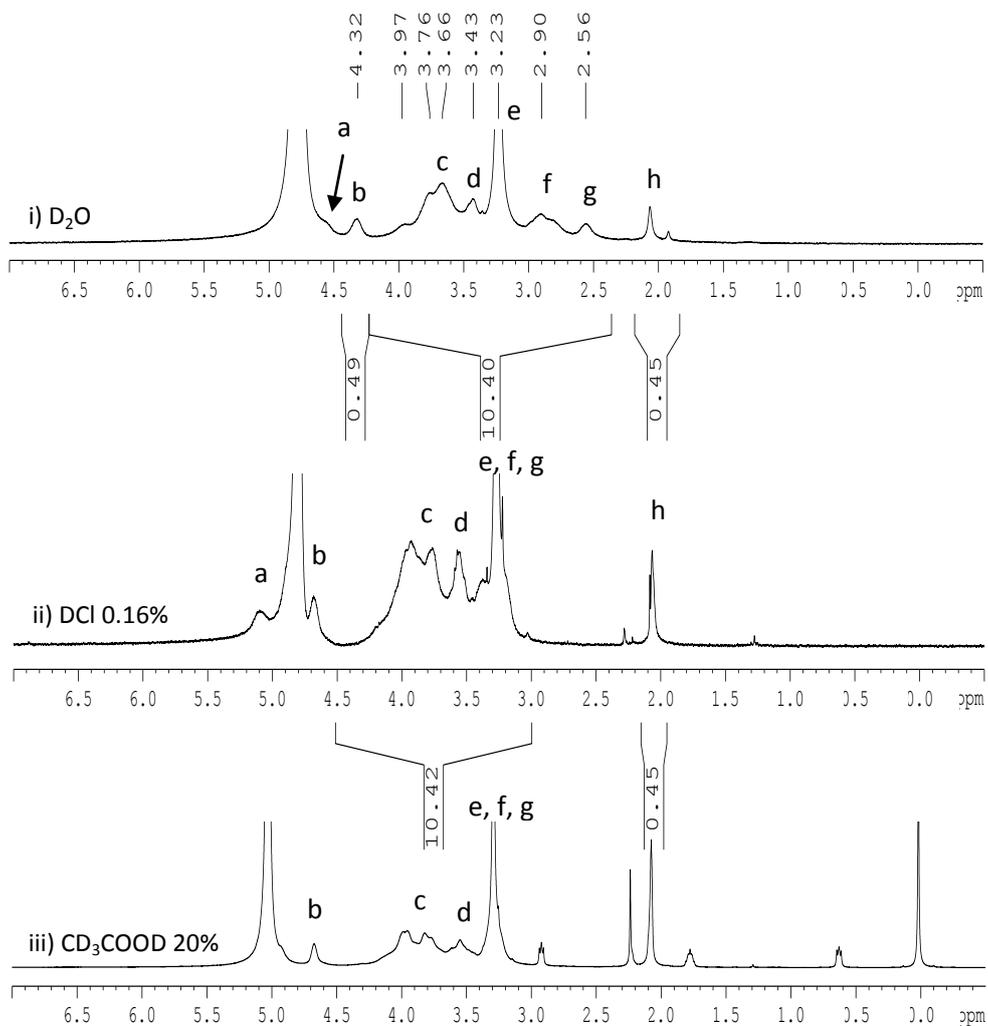


Figura 39. Espectro 1H RMN del 34_{CS4} en D_2O (i), DCl 0.16% (ii) y en CD_3COOD 5% (iii).

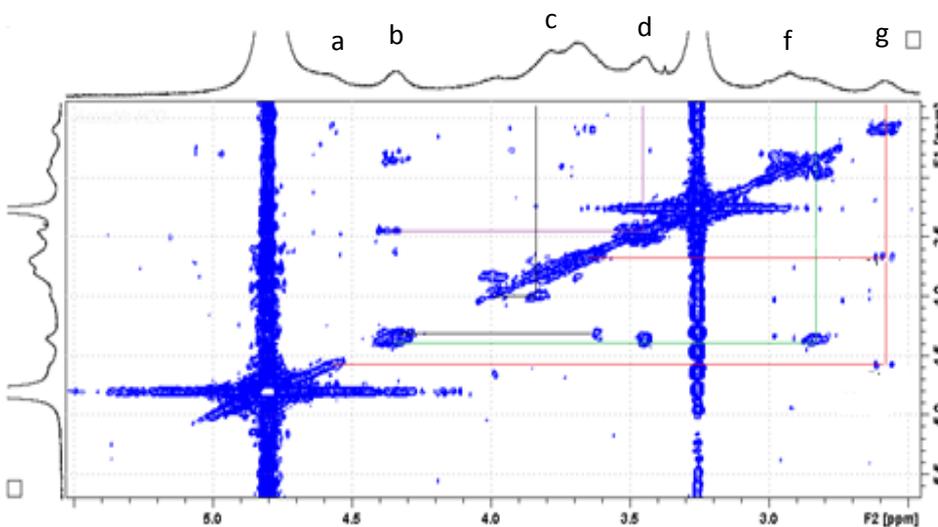


Figura 40. Espectro ^1H - ^1H COSY del producto 34_{CS4} en D_2O .

Para determinar grado de cuaternización (DQ) se utilizó la ecuación (15), teniendo en cuenta que no es posible conocer si 2.56 ppm (g) asignada a H-2 representa el $\text{H}_{2\text{GlcN}}$, $\text{H}_{2\text{GlcN}_{\text{cuat}}}$, o ambos como alternativa a otras ecuaciones utilizadas para calcular este parámetro mediante ^1H RMN.⁸⁴

$$\text{DQ (mol\%)} = \left[\frac{\left\{ (I_{\text{H2-H6}} + I_{\text{Hcuat}}) \times \frac{3\text{DA}}{100 I_{\text{NHAc}}} \right\} - 6}{13} \right] \times 100 \quad (15)$$

Donde el DA es el grado de acetilación de la muestra, $(I_{\text{H2-H6}} + I_{\text{Hcuat}})$ es la integral correspondiente a todos los protones de la región comprendida entre 4.3 y 2.4 ppm [Figura 39], en la cual están incluidos 6 hidrógenos del carbohidrato, y los 13 protones que componen la unidad de (2-hidroxi-3-trimetilamonio)propilo incorporada en la cuaternización si se exceptúa el protón del metino (4.32 ppm) [Figura 39] (señal b)], que está solapado con el $\text{H}_{1\text{GlcNAc}}$. Utilizando la ecuación (15) se obtiene un grado de cuaternización del 33.8%.

En el espectro en 0.16% DCl se observa la señal a 5.10 ppm (a) que corresponde a $H1_{GlcNcuat}$, a 4.7 ppm el protón metino (b) solapado con el $H1_{GlcNAc}$, de 4.4 a 3.0 ppm (c), la región H3-H6, a 3.6 ppm (d) el metileno unido a la amina cuaternizada. Mientras que el desplazamiento químico de esta última señal casi no se ha modificado respecto al espectro en D_2O , las señales que en D_2O salían entre 2.5-3.0 ppm (f, g) correspondientes a H2 (g) y al metileno unido al grupo amino del quitosano ($NH-CH_2$) (f) se han apantallado notablemente y aparecen ahora a 3.2-3.4 ppm solapadas con la señal originada por los protones del $N^+(CH_3)_3$. A partir de este espectro y aplicando la ecuación (15), se obtiene un DQ del 34.0% de cuaternización.

Las señales y asignaciones del espectro adquirido en 20% CD_3COOD son similares a las descritas en 0.16% DCl y en CF_3COOD/D_2O ,¹³⁴ pero al no poderse determinar la integral del $NCOCH_3$, por el solapamiento con la señal del CH_3COOH , no se utilizó este espectro para calcular el DQ.

El valor determinado de DQ (33.8%) en el espectro adquirido en D_2O permite establecer por integración de la señal a 2.58 ppm (g) que ésta corresponde al $H2_{GlcN}$ o al $H2_{GlcNcuat}$, pero no a ambos. Teniendo en cuenta que el producto descrito por Loubaki et al. es un quitosano completamente *N*-cuaternizado,¹²⁷ por lo que no contiene $H2_{GlcN}$ ni $H2_{GlcNAc}$, se infiere que la señal a 2.56 ppm en nuestro caso, asignada como H2, corresponde exclusivamente al $H2_{GlcNcuat}$.

Por otra parte, el producto de la cuaternización con GTMAC en condiciones ácidas, al que designaremos como **34**_{CS3} fue preparado en una suspensión en MeOH, a pH 3.7 y a 60 °C. El espectro de 1H RMN en D_2O de este producto es bastante similar al del ya comentado **34**_{CS4}. Para su análisis detallado realizamos un 2D $^1H-^1H$ COSY (**Figura 41**) el cual, además de las correlaciones que son comunes y ya comentadas más arriba

en el experimento bidimensional de $^{34}\text{CS}_4$, observamos que la señal a 3.98 ppm muestra correlaciones a 3.61 y 3.18 ppm.

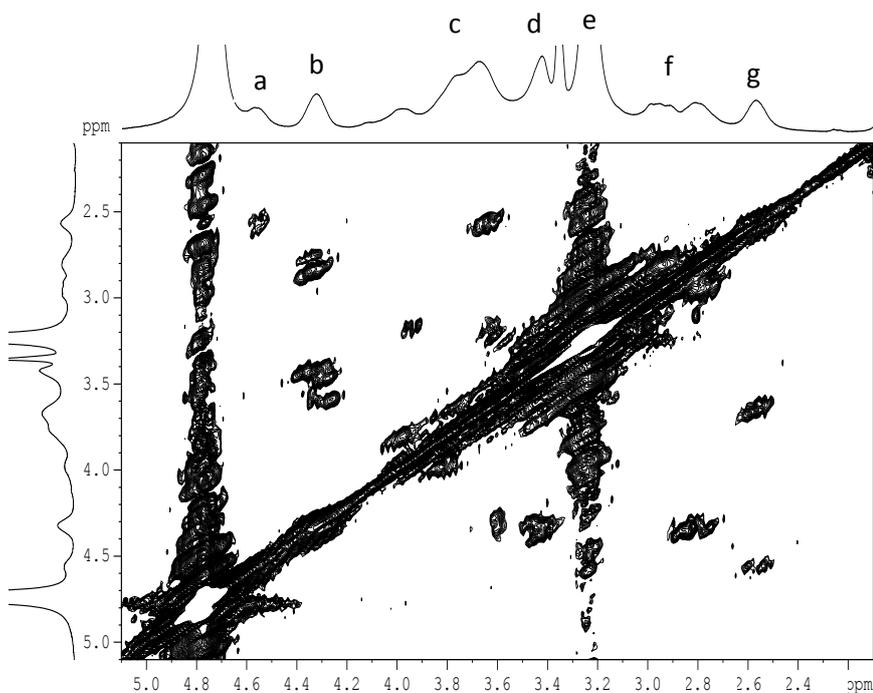
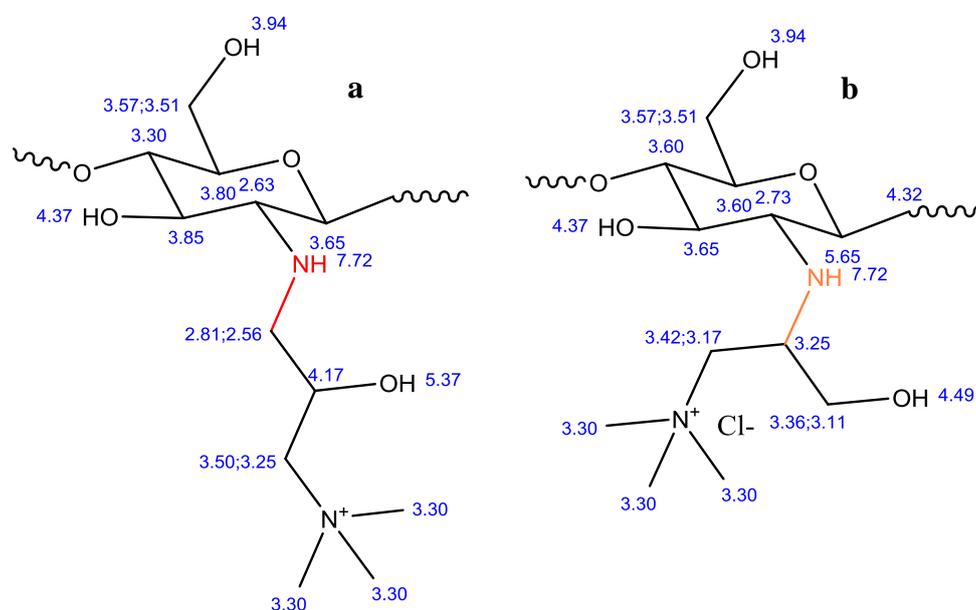


Figura 41. Espectro 2D ^1H - ^1H COSY del producto $^{34}\text{CS}_3$ en D_2O .

Este grupo de señales, de menor intensidad, podrían corresponder a la cadena de (1-hidroxi-2-trimetilamonio)etilo que aparecería como resultado de la apertura del epóxido GTMAC por ataque del nucleófilo al carbono más sustituido. Las tres señales mencionadas corresponderían, respectivamente al metino unido al grupo amino del quitosano, al metileno unido al grupo hidroxilo y al metileno unido al nitrógeno cuaternario [Simulación en **Esquema 1 (b)**]. Esto indicaría que se ha llegado a una mezcla de regioisómeros y si bien no hemos podido determinar la relación entre ambos regioisómeros, es claro que predomina el producto de apertura por ataque en al carbono menos sustituido [**Esquema 1 (a)**].



Esquema 1. Estructura resultante del ataque del quitosano al GTMAC en lado menos sustituido (a) y en el lado más sustituido (b), con valores de desplazamientos químicos simulados (*Chem Draw*[®]).

El grado de cuaternización determinado para este derivado **34**_{CS3} utilizando la ecuación (15) es de 63.5%, mayor que el calculado para el quitosano cuaternizado **34**_{CS4}, preparado con una mayor cantidad de equivalentes de GTMAC pero en suspensión acuosa a pH 7 (DQ 33.8%). El valor de DQ obtenido por nosotros mediante ¹H RMN en la cuaternización en medio ácido del quitosano es similar al calculado mediante potenciometría por Gruskiene et al.¹²⁵ para una cantidad de equivalentes de GTMAC similar, aunque en nuestro procedimiento el quitosano está en suspensión metanólica, y no disuelto en 1% CH₃COOH.

El espectro de ¹H RMN del producto *N*-(3,5-dimetilfenilcarbamoil), *N*'-[(2-hidroxi-3-trimetilamonio)propil]quitosano (**35**) presenta algunas de sus

señales similares a las de la urea **30**: a 6.97 ppm la señal para dos protones correspondiente a los hidrógenos de las posiciones *orto* del grupo dimetilfenilo, la señal para un hidrógeno a 6.79 ppm que se asigna al hidrógeno en posición *para* y a 2.27 ppm la señal para seis hidrógenos correspondiente a los metilos unidos al anillo aromático (**Figura 42**). Por otro lado, a 4.67 ppm se solapan las señales de los $H1_{GlcNAc}$, $H1_{GlcNurea}$ y el $CH(OH)_{cuat}$, entre 4.30 y 3.00 ppm se encuentran los protones H3-H6, $H2_{GlcNurea}$, $H2_{GlcNAc}$, $H2_{GlcN}$ y $NH-CH_2-CH(OH)-CH_2-N^+(CH_3)_3Cl^-$, estando los protones del grupo trimetilamonio a 3.29 ppm. El grado de cuaternización (DQ) para el producto **35** se determinó teniendo en cuenta el grado de sustitución calculado para la urea **30** (20.5%, Capítulo 3 de esta memoria), y en consecuencia referenciando las integrales de la región aromática (3 protones) a $[3 \times 0.205 = 0.615]$ y aplicando la ecuación (16). Se obtiene así un DQ del 45.8%.

$$DQ \text{ (mol\%)} = \left[\frac{(I_{H2-H6} + I_{H_{cuat}}) - 6}{13} \right] \times 100 \quad (16)$$

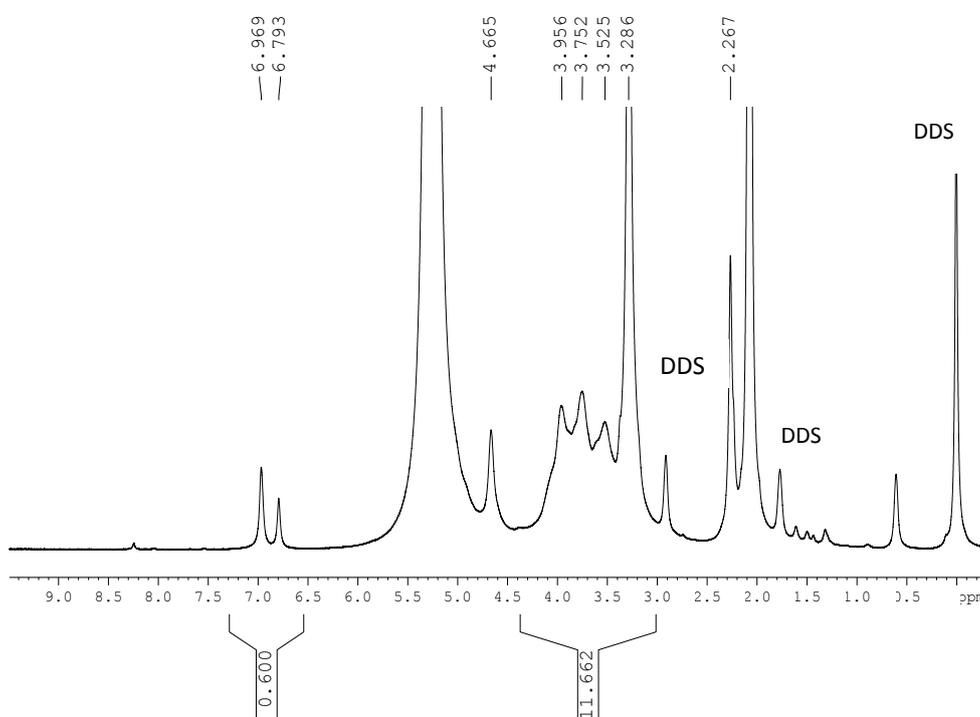


Figura 42. Espectro ^1H RMN en 20% CD_3COOD del producto cuaternizado **35**.

Los derivados cuaternizados **36** y **37** se sintetizaron, como se ha indicado anteriormente, partiendo del quitosano cuaternizado **34**_{CS3}. La imina **36** fue soluble en H_2O . Debido a la hidrólisis de las iminas derivadas de quitosano en las condiciones de solubilización de la muestra para el ^1H RMN (1-50% CD_3COOD), decidimos realizar el espectro de ^1H RMN de la imina cuaternizada **36** en D_2O . Sin embargo, al realizar un filtro de difusión de la imina solubilizada en D_2O solo se observó la señal del quitosano cuaternizado (**Figura 43**) por lo que se deduce que el producto, la imina **36**, no es estable en D_2O .

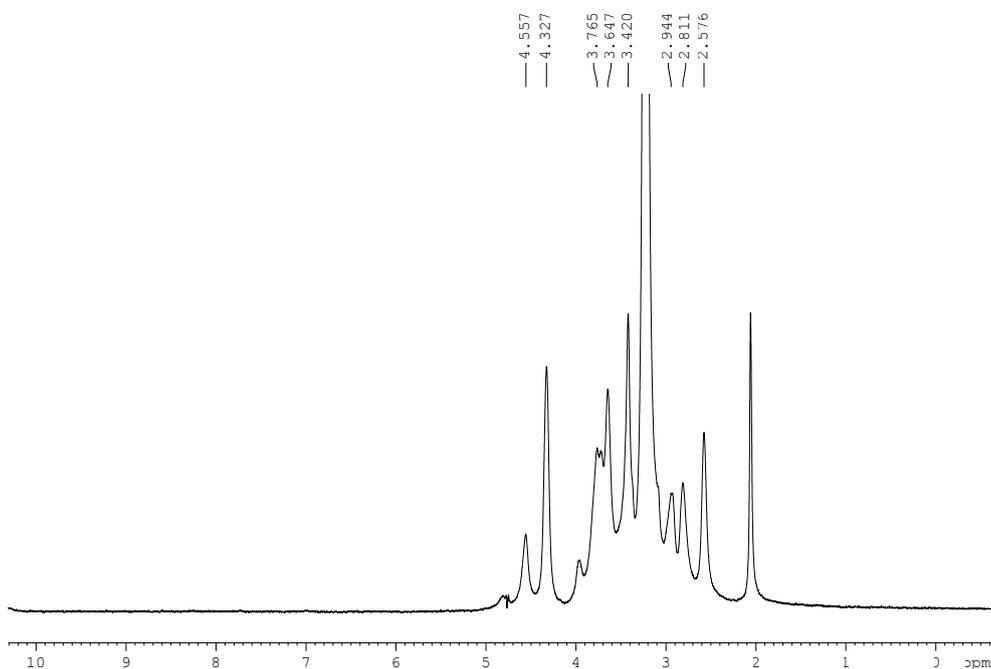


Figura 43. Filtro de difusión ^1H RMN de **36**.

El espectro de ^1H RMN en D_2O del compuesto *N*-(hidroxibencil), *N'*-(2-hidroxitrimetilamonio)quitosano (**37**) (Figura 44) presenta en la región aromática dos señales a 7.31 y 6.92 ppm para dos hidrógenos cada una, que se asignan respectivamente a los protones H2' y H3' del anillo aromático. El resto de señales son similares a las mostradas por el quitosano cuaternizado **34**_{CS3}. Así, la señal intensa que aparece a 3.23 ppm se asigna a los protones del $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, la señal a 4.57 ppm corresponde a H1_{GlcN_{cuat}}, a 4.32 ppm se solapan las señales de los H1_{GlcNAc} y el CH(OH)_{cuat}. La señal para dos hidrógenos a 3.42 ppm corresponde al metileno unido al nitrógeno cuaternario y en la región comprendida entre 4.19 y 3.53 ppm están los H3-H6. En cuanto a la región entre 3.05 y 2.50 ppm, asignamos la señal a 2.57 ppm a H2 y las señales a 2.95 y 2.81 ppm a cada uno de los dos protones

diastereotópicos del metileno unido al quitosano. Finalmente, la señal a 2.07 ppm correspondería al metilo del grupo acetamido. El DS obtenido para el producto 37 se determinó empleando la ecuación (17), obteniéndose un valor de 11.8%.

$$17 \text{ DS (mol\%)} = \left[\frac{I_{\text{Ar/n x 3DA}}}{I_{\text{COCH}_3}} \right] \quad (17)$$

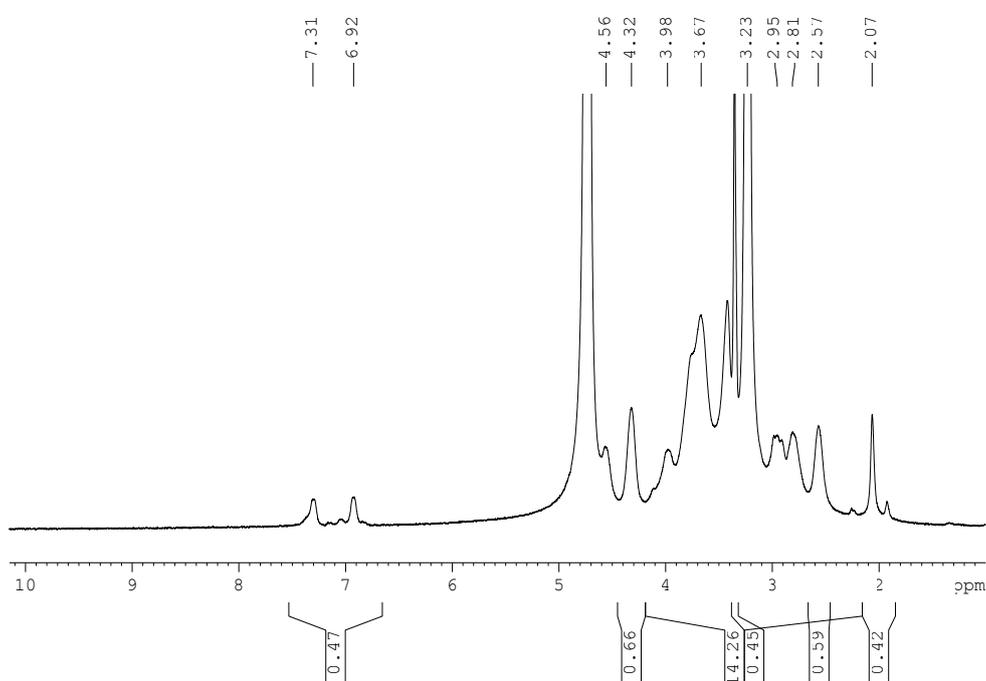


Figura 44. Espectro ^1H RMN del compuesto **37** en D_2O .

5.2.4 Caracterización de la urea cuaternizada 35 mediante ^{13}C CPMAS RMN.

El ureidil derivado cuaternizado *N*-3,5-dimetilfenilcarbamoil, *N*'-[(3-hidroxitrimetilamonio)propil]quitosano (**35**) tiene señales similares en el

espectro ^{13}C CPMAS RMN al del ureidil derivado de partida **30** (**Figura 45**): a 174.2 ppm la señal correspondiente al C=O del grupo acetamido, a 158.3 ppm el C=O de la urea, la región de los carbonos aromáticos entre 145.0 a 113.0 ppm y los carbonos del carbohidrato, C-1 a 104.4 ppm, C2 a C6 entre 95 y 50 ppm y el N-COCH₃ a 21.7 ppm. También aparecen las señales correspondientes a las unidades de la agrupación (2-hidroxi-3-trimetilamonio)propilo incorporadas en la reacción con GTMAC: el C metínico, y dos C metilénicos, uno de ellos unido al N del quitosano y el otro unido al nitrógeno cuaternario que se solapan a los C2-C6 en la región entre 95 y 50 ppm, sobresaliendo claramente la señal correspondiente a los tres C de los metilos del grupo trimetilamonio a 55.1 ppm. Para determinar el grado de cuaternización (DQ) se ha utilizado la ecuación (18), donde el valor “6” es el número de C de la unidad (2-hidroxi-3-trimetilamonio)propilo.

$$18 \text{ DQ (mol\%)} = \left[\frac{[I_{\text{cuat}} + I_{\text{(C2-C6)}}] - 5}{I_{\text{C1}}} \right] \times 100 \quad (18)$$

Se obtiene así un DQ de 41.0%, valor cercano al determinado por ^1H RMN (45.8%).

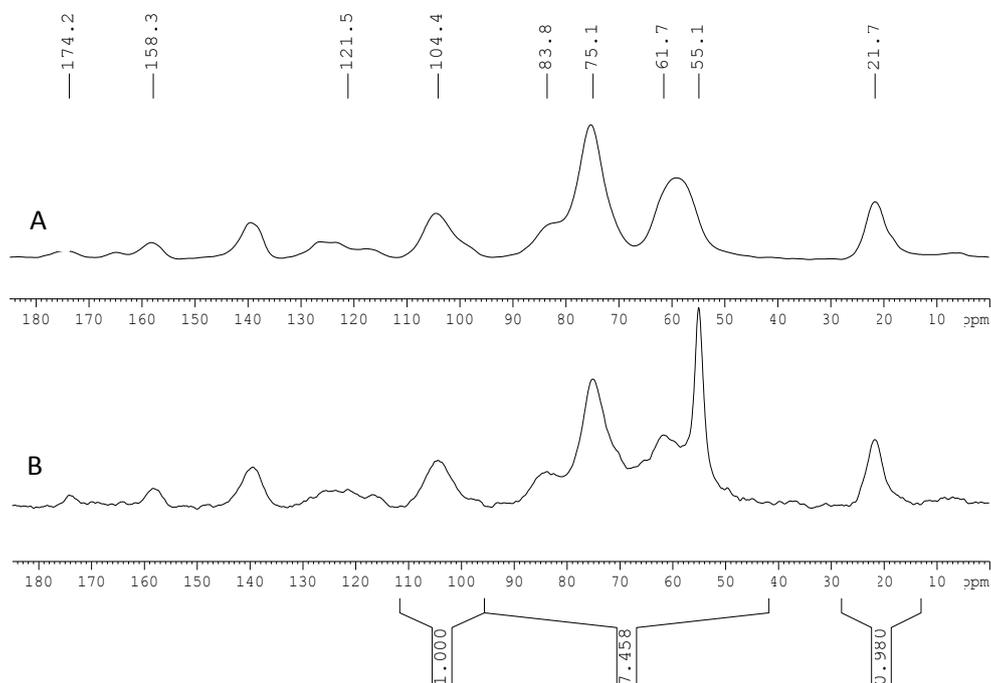


Figura 45. Espectro de ^{13}C CPMAS RMN la urea derivada de quitosano **30** (A) y de su derivado *N*-cuaternizado **35** (B).

A modo de resumen, se indican en la Tabla 12 los grados de sustitución y cuaternización de los derivados cuaternizados de quitosano estudiados mediante ^1H RMN y en un caso mediante ^{13}C CPMAS RMN. En la reacción de cuaternización del quitosano realizada en medio ácido se obtuvo tanto un mejor rendimiento en el producto **34**_{CS3}, como un mayor grado de cuaternización que en la cuaternización a pH= 7.0. Comparando los DS de los compuestos **35** a **37**, se observa que se obtiene un DS menor cuando se parte de un producto ya cuaternizado (DS **35** > **37** > **36**).

Tabla 12. Cuaternizaciones realizadas: Condiciones de reacción, DQ y DS determinados mediante ¹H RMN.

Compuesto de partida	Condiciones de reacción ^a	Producto	Rto. (%)	DQ (mol%)	DS (mol%)
CS4	1. H ₂ O, GTMAC (6.0 mol-eq) 24 h, pH 7.0, 60 °C	34 _{CS4}	55	33.8	-
CS3	^a 1. MeOH, GTMAC (3.6 mol-eq) 24 h, pH 3.7, 60 °C	34 _{CS3}	83	63.5	-
30	1. H ₂ O, GTMAC (6.0 mol-eq) 24 h, pH 7.0, 60 °C	35	62	45.8 ^d 41.0	20.5
34 _{CS3}	^a 1. MeOH, Ar-CHO (0.70 mol-eq) 24 h, pH 3.7, 60 °C	36	94	63.5	-
36	^a 1. MeOH, pH=3.7, t.a. 2.NaBH ₄ 0.7 mol-eq	37	89	63.5	11.8

^a La síntesis se realizó en una solución metanólica de 0.12 M CH₃COOH.

^b El quitosano fue tratado con el correspondiente compuesto de partida con los equivalentes descritos en la tabla.

^c Rendimiento (%) = Peso del quitosano *N*-sustituido (g) x [166.72/ (peso del quitosano (g) x FW calculado del GlcN *N*-sustituido)] x 100; FW del GlcN *N*-sustituido = 166.71 + (DS/100) x 151.63. ^d DQ determinado por ¹³C CPMAS RMN

CAPITULO 5. APLICACIONES

6.1 Formación de Films a partir de Quitosano y de sus derivados

6.1.1 Antecedentes

La capacidad del quitosano para la formación de films se debe a varias propiedades que este biopolímero posee, como son la capacidad de formación de puentes de hidrógeno inter- e intra-moleculares, su carácter policatiónico y su viscosidad. Para la formación de films el quitosano se disuelve en el medio apropiado, en la mayor parte de los casos H₂O acidificada, y la disolución se vierte en una superficie plana dejando que el disolvente se evapore.¹³⁹

Junto con la utilización del quitosano como agente quelante de metales,¹⁴⁰ la propiedad filmogénica del quitosano fue una de las primeras aplicaciones investigadas de este biopolímero.¹⁴¹ Muzzarelli¹⁴² describió inicialmente dos metodologías para obtener films de quitosano: la primera mediante la evaporación del disolvente en la solución de quitosano (método de *casting*), y la segunda basada en la obtención del film de quitosano a partir de la película quitinosa de un molusco cefalópodo (jibia). Con el último método se obtuvieron films de quitosano con propiedades mecánicas inferiores a las obtenidas por el método de *casting*, por lo que el método de evaporación del disolvente es el utilizado en la actualidad.

¹³⁹ Dang, K. M.; Rangrong, Y. R. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *115*, 575–581.

¹⁴⁰ Muzzarelli, R. A.; O. Tubertini. *Talanta* **1969**, *16*, 1571–1577.

¹⁴¹ Arai, K.; Kinumaki T.; Fujita T. *Bull Tokai Reg Fish Res Lab.* **1968**, *56*, 89–92.

¹⁴² Muzzarelli, R. A.; Isolati A.; Ferrero, A. *Ion Ex. Membr.* **1974**, *1*, 193–196.

Se ha descrito la formación de films de quitosano a partir de disoluciones de distintos ácidos tales como ácido acético, fórmico, cítrico, láctico, propiónico, o clorhídrico.^{143,144} Kim et al.¹⁴⁵ hacen una comparación de las propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua (WVP) de films preparados a partir de varios ácidos utilizando el *casting* a temperatura ambiente, para muestras de quitosano con distintos grados de desacetilación (DD). Independientemente del tipo de ácido utilizado para solubilizar el quitosano se obtuvieron mayores valores permeabilidad al vapor de agua a mayor DD. Los films obtenidos a partir del ácido acético y propiónico mostraron valores menores de WVP y mayores valores de resistencia a la tracción [Tensile strength (TS)] en comparación con los obtenidos a partir de ácido láctico y fórmico. Los films preparados a pH 3 fueron menos permeables al vapor de agua que los preparados a pH 4 y 5. La elongación a rotura (EB) es dependiente del tipo de ácido utilizado y del pH, pero no del DD. Los films preparados a partir de ácido láctico tuvieron los mayores valores de % (EB), aunque menores valores de TS.

En términos de degradabilidad de films, Freier et al.¹⁴⁶ encontraron que aquellos films preparados con muestras de quitosano de muy bajo o muy alto valor de DD, eran degradados mucho más lentamente por parte de la lisozima, aspecto importante para la aplicabilidad del material.

¹⁴³ Hsu H.; Adigun, O.; Taylor L. S.; Murad, S.; Harris, M. T.; *Chem. Eng. Sci.* **2015**, *126*, 1–9.

¹⁴⁴ Begin, A.; Van Calseteren, MR. *Int J Biol Macromol.* **1999**, *26*, 63–67.

¹⁴⁵ Kim, K. M.; Son, J. H.; Kim, SK.; Weller, C. L.; Hanna, M.A. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, 119-124.

¹⁴⁶ Freier T.; Koh H.S.; Kazazian, K.; Shoichet, M. S. *Biomaterials* **2005**, *26*,5872–5878.

Los films de quitosano no son termoplásticos porque se degradan antes de licuarse y por lo tanto no pueden ser extruidos, moldeados, estirados, como es el caso de envasados termoplásticos convencionales limitando su campo de aplicaciones.¹⁴⁷ Se pretende que la modificación del quitosano o su utilización con otros polímeros (celulosa) subsane esta limitación.¹⁴⁸

Se ha descrito la obtención de films a partir de derivados de quitosano. Estos materiales se han preparado por el método de *casting* o por modificación superficial del film de quitosano.¹⁴⁹ Las propiedades mecánicas y de impermeabilidad del quitosano pueden ser moduladas por modificación química del quitosano, como la alquilación. La unidad de aquilo puede reducir los puentes de hidrógeno intra- e inter-moleculares, introduciendo características plásticas en el derivado, así como disminuyendo la permeabilidad al vapor de agua.¹⁵⁰ Jagadish et al.¹⁵¹ describen la preparación de films de *N*-(vainillil)quitosano y de *N*-(4-hidroxibencil)quitosano en las que obtienen films más resistentes con valores de TS ligeramente mayores que las de los quitosanos de partida (53, 50 MPa; respectivamente), aunque con valores menores de % EB. Estos films de derivados presentan menores valores de permeabilidad al vapor de H₂O que los del quitosano de partida, así como reducción de la formación de aflatoxinas en los ensayos antibacteriales frente al hongo *Aspergillus*

¹⁴⁷ Pelissari, F. M.; Yamashita, F.; Grossmann, M. V. *Int. J. of Food Sci. Tech.* **2011**, *46*, 702–710.

¹⁴⁸ Dang K. M.; Rangrong Y. R. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *115*, 575–581.

¹⁴⁹ Varawut T., V.; Pongchaisirikul, N.; Hovena, V. P. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 937–942.

¹⁵⁰ Venugopal, V. *Crustacean Polysaccharides: Chitin and Chitosan*. CRC Press. Taylor & Francis Boca Raton, USA, 2011, pp 61-88.

¹⁵¹ Jagadish, R.S.; Divyashree, K.N.; Viswanath, P.; Srinivasc, P.; Raj, B. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 110–116.

flavus, obteniéndose características más apropiadas para la aplicación en el envasado de alimentos que con los preparados a partir del quitosano sin modificar.

Las aplicaciones potenciales de los films de quitosano o preparados a partir de derivados de quitosano se extienden no sólo a la alimentación,^{152,153} sino también a la medicina, la farmacéutica, la industria fotográfica¹⁵³ y la cosmética.¹⁵⁴

En aplicaciones farmacéuticas, los films de quitosano constituyen junto a las tabletas, cápsulas, microesferas, nanopartículas y geles, una forma de administración controlada de fármacos.^{155,156} El uso de películas de quitosano para el tratamiento de heridas cutáneas es una opción viable puesto que se puede administrar el fármaco de forma localizada y con una liberación sostenida en el sitio de acción (Figura 46). Aoyagi et al.¹⁵⁷ describen el uso de películas de quitosano en conjunto con el hidrocloreto de minociclina para el vendaje de heridas cutáneas en el tratamiento de quemaduras en ratas. El uso de films es una alternativa más conveniente que las cremas, que tienen que ser aplicadas continuamente debido a su fácil eliminación. En adición, el film de quitosano ofrece protección a la herida, absorbe el exudado, tiene acción antibacteriana,¹⁵⁸ promueven la

¹⁵² Aider, M. *Food Sci. Tech.* **2010**, *43*, 837–842.

¹⁵³ Dutta, P. K.; Tripathi, S.; Mehrotra, G. K.; Dutta, J. *Food Chem.* **2009**, *114*, 1173-1182.

¹⁵⁴ Hirano, S. *Biotechnol Annual Rev.* **1996**, *2*, 237-258.

¹⁵⁵ C. Remuñán-López, R. Bodmeier. *J. Control. Rel.* **1997**, *44*, 215-225.

¹⁵⁶ Dasha M., Chiellini F.; Ottenbrite R.M.; Chiellini E.; **2011**, *Progress Polym. Sci.*, *36*, 981–1014.

¹⁵⁷ Aoyagi, S.; Onishi, H.; Machida, Y. *Int. J. Pharm.* **2007**, *33*, 138-145.

¹⁵⁸ Fernandez-Saiz, P.; Lagarón, J. M.; Ocio, M. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3298–330.

cicatrización de las heridas al estimular la proliferación de los fibroblastos¹⁵⁹ y no presentan citotoxicidad, independientemente del DD, en células cutáneas como queratinocitos y fibroblastos.¹⁶⁰

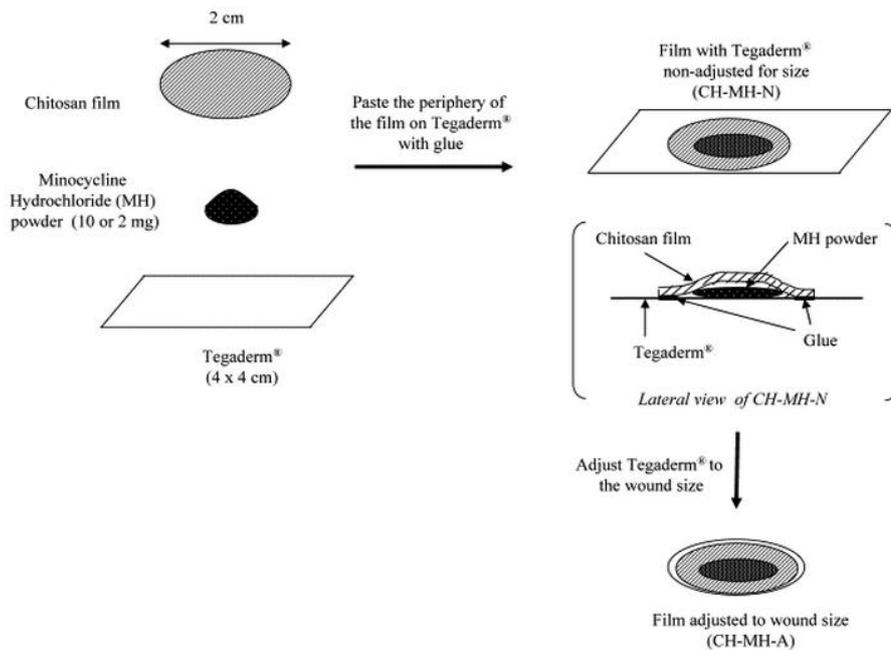


Figura 46 Preparación de un apósito de herida hecho de film de quitosano, hidroclicloruro de minociclina y Tegaderm®, llamados CH-MH-N and CH-MH-A. Adaptado de Aoyagi et al.¹⁵⁷

6.1.2 Resultados y Discusión

¹⁵⁹ Deepa R.; Willi P.; Anilkumar, T.V.; Chandra P. S. *J Biomed. Mater. Res. Part A*. **2015**, *103*,330-340.

¹⁶⁰ C. Chatelet, O. Damour, A. Domard. *Biomaterials* **2001**, *22*, 261-268.

Los métodos usuales de casting en la preparación de films de quitosano son los de secado a temperatura ambiente, en horno, a vacío, y secado con aire caliente.^{161,162,163,164} Por otro lado, la preparación de films de quitosano por secado con microondas ha sido escasamente descrita en la literatura^{165,166} sin incluir detalles de las propiedades mecánicas de los films preparados, como la resistencia a la tracción o el módulo de Young.

El procedimiento que nosotros hemos desarrollado consiste en disolver el quitosano en CH₃COOH al 1% con agitación y, tras filtración del material suspendido y desgasificación, se procede a la irradiación de la solución viscosa obtenida con microondas a 700 W durante 10 minutos seguido de enfriamiento durante 5 minutos. El ciclo se repite hasta eliminar todo el H₂O. Por su parte, para la preparación de films de derivados de quitosano, se procedió a sumergir el film de quitosano previamente preparado en una disolución metanólica de CH₃COOH 0.12M conteniendo el aldehído correspondiente (4-nitrobenzaldehído, 4-hidroxibenzaldehído o bifenilcarboxaldehído) y, tras agitación a temperatura ambiente durante 24 horas, se saca el film modificado y se lava varias veces con MeOH y CH₂Cl₂ y se deja secar.

¹⁶¹ Mayachiew, P.; Devahastin S. *Dry. Technol.* **2008**, *26*, 176–185.

¹⁶² Zuo, P.P; Feng; H.; Xu; Z.; Zhang, L.; Zhang, Y., Xia W.; Zhang, W. *Chem. Cent. J.* **2013**, *7*, 1-11.

¹⁶³ Srinivasa, P.C.; Ramesh, M. N.; Kumar, K. R.; Tharanathan, R. N. *J. Food Eng.* **2004**, *63*,79–85.

¹⁶⁴ Thakhiew, W.; Devahastin, S.; Soponronnarit, S. *J. Food Eng.* **2010**, *99*, 216–224.

¹⁶⁵ Cárdenas, G.; Díaz, J. V.; Meléndrez M. F.; Cruzat C. *Polym. Bull.* **2008**, *61*, 737–748.

¹⁶⁶ Wongpanit, P.; Sanchavanakit, N.; Pavasant, P.; Supaphol, P.; Tokura, S.; Rujiravanit, R. *Macromol. Biosci.* **2005**, *5*, 1001–1012.

A lo previamente descrito para la formación de films utilizando radiación de microondas, nuestro procedimiento añade ciclos de radiación de 10 minutos con enfriamiento de 5 minutos, lo que evita su degradación a la potencia utilizada (700 W). Ello debe disminuir además el esparcimiento y la evaporación descontrolada de la disolución formadora del film, cuya viscosidad va reduciéndose al aumentar la temperatura al cabo de 10 minutos de calentamiento ($> 140\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Los films preparados a partir de 4-nitrobenzaldehido y **CS1** ($M_w 42400\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $DD = 87\%$) presentaron una coloración amarillenta, mientras que los films preparados a partir de 4-hidroxibenzaldehido o bifenilcarboxialdehido y los quitosanos de peso molecular bajo y medio [**CS3** ($M_w 86352\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $DD = 86\%$) y **CS6** ($M_w 160253\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $DD = 83\%$), respectivamente] fueron transparentes.

6.1.2.1 Análisis de los films de quitosano y sus derivados mediante FT-IR.

En la Figura 47 se presentan los espectros de FT-IR del film de quitosano (**FCS3**) neutralizado tras su preparación con una solución metanólica de NaOH 1M (línea azul) y el film de quitosano sin neutralizar (línea verde) en comparación con el espectro del quitosano de partida **CS3** (línea roja). Se observan similitudes y diferencias en las señales. Las bandas comunes para los tres materiales son las de tensión de los enlaces OH y NH en la región de $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, las señales a $2850\text{-}2900$ y 1647 cm^{-1} , la región que corresponde a los enlaces O-glicosídicos (1150 , $1020\text{-}1075$ y $890\text{-}900\text{ cm}^{-1}$), y las bandas de tensión de C-O. El espectro del film de quitosano sin

neutralizar (línea verde) presenta una banda¹⁶⁷ a 1543 cm^{-1} correspondiente a la unidad NH_3^+Ac^- que desaparece con la neutralización, demostrando que se ha realizado este proceso correctamente (línea azul). También en el espectro del film sin neutralizar (línea verde) se observa con mayor intensidad el pico a 1375 cm^{-1} que puede reflejar la presencia de CH_3COO^- que es eliminado mediante los lavados con H_2O posteriores a la neutralización. Esto permite concluir que no se ha producido degradación alguna como consecuencia del proceso de formación del film mediante nuestro procedimiento de *casting* por microondas. Un resultado similar se obtuvo en la determinación análoga realizada para los quitosanos **CS1** y **CS6** y sus films correspondientes.

También se analizaron los films obtenidos (**BFCS3**, **NFCS3** y **HFCS3**) a partir de los derivados de quitosano preparados a partir de **CS3** y aldehidos (bifenilcarboxaldehido, 4-nitrobenzaldehido y 4-hidroxibenzaldehido) observándose espectros similares a los obtenidos para los compuestos *N*-(bifeniliden)quitosano (**11**) *N*-(4-nitrobenciliden)quitosano (**12**), *N*-(4-hidroxibenciliden)quitosano (**13**), descritos en el Capítulo 2 de esta Memoria, relativo a las reacciones de quitosano con aldehidos. En particular, se observó la desaparición de las bandas de tensión del carbonilo de los aldehidos de partida (1693 , 1703 y 1683 cm^{-1} , respectivamente) y la aparición de las bandas de tensión de enlace $\text{C}=\text{N}$ de imina (1638 , 1643 y 1637 cm^{-1} , respectivamente).

¹⁶⁷ Kasaai, M.R. *Carbohydr. Polym.* **2010**, 79, 801-810.

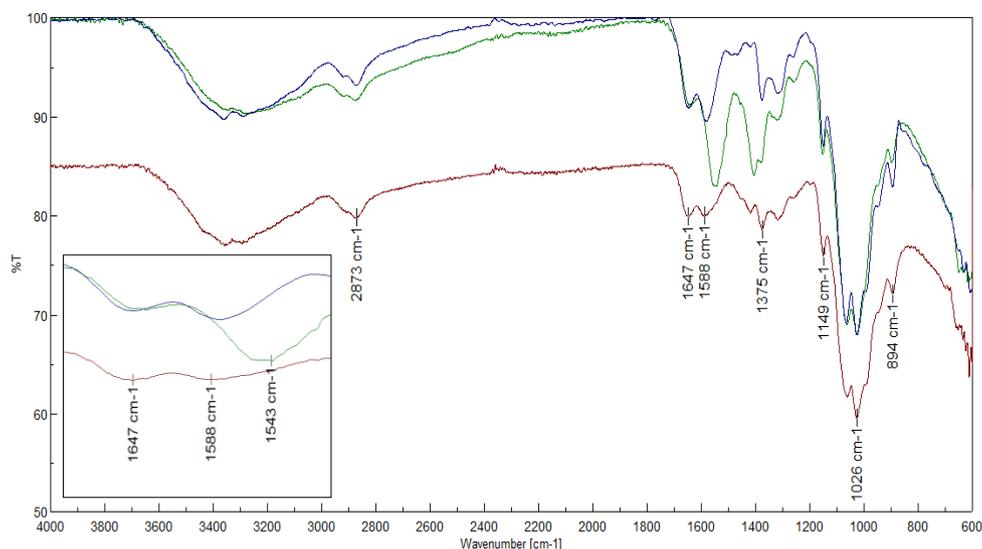


Figura 47. FT-IR de: (a) film de quitosano (**FCS3**) neutralizado tras su preparación con una solución metanólica de NaOH 1M (línea azul); (b) film de quitosano (**FCS3**) sin neutralizar (línea verde); (c) Quitosano de partida **CS3** (línea roja).

6.1.2.2 Solubilidad de los films de quitosano y sus derivados.

Se encontró que los films de todas las muestras de quitosano que no fueron neutralizadas con solución metanólica de NaOH 1 M fueron solubles en H₂O y en soluciones de distintas concentraciones de CH₃COOH, mientras que los films neutralizados no eran solubles en H₂O ni en disoluciones de CH₃COOH de concentraciones comprendidas entre el 0.5 y 1%, siendo, en cambio, solubles en disoluciones más concentradas de CH₃COOH (5-50%).

Los films derivados de quitosano y de los aldehidos bifenilcarboxialdehido y 4-nitrobenzaldehido (**BFCS3** y **NFCS3**,

respectivamente), fueron insolubles excepto en disoluciones de CH_3COOH al 25 % y 50 %. El film derivado de quitosano y del 4-hidroxibenzaldehido (**HFCS3**) presentó una solubilidad similar al film del quitosano neutralizado.

En la Figura 48 se muestran los films **BFCS3** (izquierda) y **FCS3** no neutralizado (derecha) después de 5 minutos de mantenerse sumergidos en H_2O destilada. Se observa que **FCS3** tiene tendencia a formar una estructura de bastón que gradualmente se va solubilizando en el H_2O , mientras que **BFCS3** mantiene su integridad.

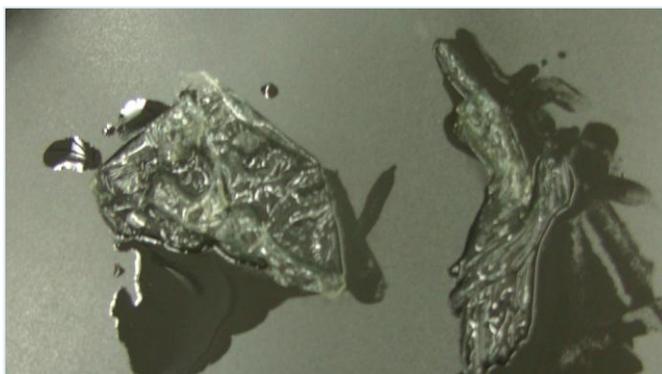


Figura 48 Prueba de solubilidad de films del derivado de quitosano y bifenilcarboxaldehido (**BFCS3**) (izquierda), y de quitosano (**FCS3**) no neutralizado (derecha).

6.1.2.3 *Propiedades mecánicas de films derivados de quitosano.*

De los films de derivados preparados, el obtenido a partir del quitosano **CS3** y el bifenilcarboxaldehido, denominado **BFCS3**, fue el que presentó mejor aspecto cualitativo y de textura por lo que se eligió para el análisis de sus propiedades mecánicas. La dificultad en el procedimiento de

modificación superficial de films de quitosano¹⁶⁸ para obtener derivados de éste estriba en la necesidad de disponer de muestras de superficie lisa para la determinación de sus propiedades mecánicas. Durante el proceso de modificación, la evaporación del disolvente puede causar rugosidades en la superficie del film que afectarán a los resultados obtenidos. En la Figura 49 se muestra el gráfico del ensayo de tracción en el que se representa la carga frente a la deformación (ΔL) que se realizó sobre la muestra del film **FCS6**, que había sido preparado previamente a partir de quitosano **CS6** disuelto (2% m/v) en CH_3COOH al 1%. Este mismo tipo de representación gráfica se realizó sobre el resto de las muestras para obtener los datos de la Tabla 13.

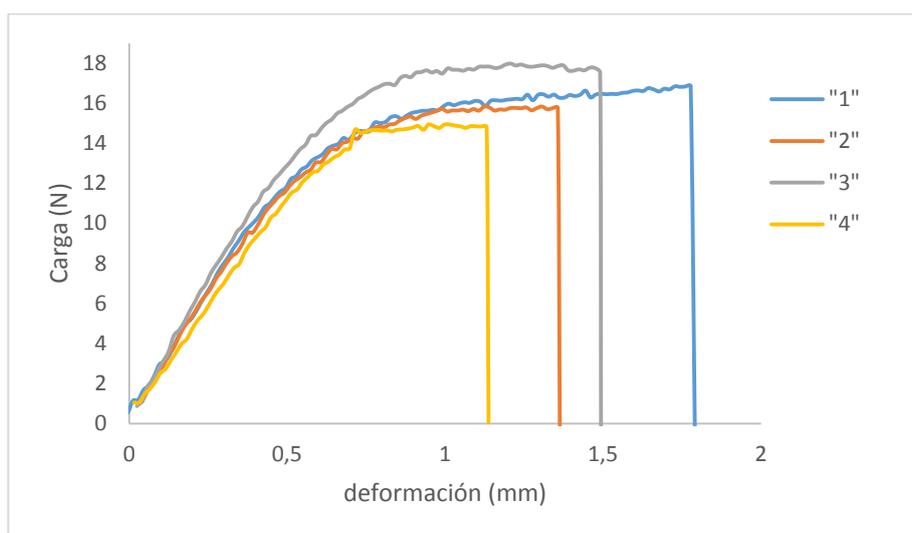


Figura 49 Ensayo de tracción. Representación de la carga frente a la deformación de una muestra del film de quitosano **FCS6** preparada al 2 % m/v en una disolución de CH_3COOH al 1% (Tabla 13, fila 1).

¹⁶⁸ Fang, Y.; Ning, G.; Hu, D.; Lu, J. *J. Photoch Photobiol. A.* **2000**, *135*, 141-145.

A partir de los datos de esta tabla, cuando se comparan los films preparados a partir del quitosano de peso molecular medio (**CS6**) utilizando disoluciones de CH₃COOH del 1% y del 2% (m/v) (Filas 1 y 6, Tabla 13) se observa una mayor desviación estándar para el film preparado al 1 % en todas las propiedades determinadas. Esto puede ser debido a la menor viscosidad de la disolución de concentración inferior y por tanto a la dispersión mayor de esta solución sobre el plato del microondas, lo que da lugar a un material poco homogéneo en este caso. Por tanto, se continuó preparando el resto de muestras con films que provenían de disoluciones al 2% para obtener una mayor homogeneidad. Además, a mayor concentración de quitosano se requiere menor tiempo de eliminación del disolvente en el proceso de formación del film.

Tabla 13. Propiedades mecánicas de films preparados por casting en microondas.

Muestra	Espesor ^a (mm)	Elengación a la rotura ^b (%EB)	Carga máxima (N)	Resistencia a la tracción ^c (TS) (MPa)	Módulo de Young ^d (E) (MPa)
FCS6 (2%)	0.045	2.8	16.3 ± 1.3	61.7± 3.8	5129 ± 343
FCS3 (2%)	0.037	2.8	13.5± 1.4	61.2± 4.2	4561 ± 402
FCS3 (2%)-TPP	0.050	2.2	13.5 ± 0.8	42.1 ± 2.1	3848 ± 355
BFCS3	0.052 ^e	1.2	13.2 ± 1.5	42.0± 6.1	4015 ± 168
FCS1 (2%)	0.029	2.3	8.0 ± 0.7	45.5± 2.9	3360 ± 320
FCS6 (1%)	0.026	5.1 ^f	6.0 ± 1.4	39.3± 7.0	2595± 500
FCS6M (2%) ^g	0.052	7.2	11.1 ± 0.9	35.6 ± 2.8	2218 ± 203

^aNo se indican con barra de error valores de desviación standard menores de 0.01.

^bElongation at Break (EB). %EB = $(L_0/\Delta L_b) \times 100$ ΔL_b = deformación a la rotura

^cTensile strength (TS). $TS = \sigma = F/A_0$ ¹⁶⁹

F= carga, A_0 = área transversal

^dMódulo de Young (E). $E = FL_0/A_0\Delta L$;

L_0 = longitud inicial de la probeta

^eValor de desviación estándar ± 0.02 .

^fValor de desviación estándar ± 3 .

^gEnsayo realizado sumergiendo el film **FCS6** en Metanol durante 10 s previo a la medición.

Se deduce de los datos presentados en la tabla que el espesor de los films de quitosano preparados es dependiente tanto de la concentración de quitosano (1% ó 2%) en la disolución generadora del film como del M_w del quitosano de partida. A mayor peso molecular y a mayor concentración, mayor es el espesor del film preparado.

En los ensayos de deformación a la rotura (EB) se observan valores entre 1.2 y 7.2 % de la longitud inicial de la probeta siendo el film del derivado de quitosano y bifenilcarboxialdehido (**BFCS3**) el que presenta menor % de deformación y la muestra de quitosano de peso molecular medio **FCS6M** (2%), sumergido en MeOH previo a la medición (línea 6, Tabla 13), el que experimentó la mayor deformación. No se observa una variación significativa en el % de deformación a la rotura entre films de los quitosanos de distinto peso molecular (líneas 1, 2 y 5 en Tabla 13).

Tampoco hay diferencias significativas en la resistencia a la tracción (TS) del film del quitosano **FCS6** (2% m/v) (61.7 ± 3.8 MPa) en comparación con el **FCS3** (2% m/v) (61.2 ± 4.2 MPa), pero disminuye para el film de quitosano **FCS1** (2% m/v) (45.5 ± 2.9 MPa). El menor valor de TS corresponde al film **FCS6M** (2% m/v) (35.6 ± 2.8 MPa).

Examinando los valores del módulo de Young presentados en la Tabla 13 se observa que a mayor peso molecular del quitosano de partida

¹⁶⁹ Stevens, M. P. Chemical Structures and Polymers Properties. *Polymer Chemistry. An Introduction*, Third Edition; Oxford University Press: New York, 1999; pp 96-128.

empleado en la preparación del film, mayor es el módulo de Young (3360 ± 320 , 4561 ± 402 y 5129 ± 343 MPa para **FCS1**, **FCS3** y **FCS6**, respectivamente). Por otra parte, el film del derivado de quitosano y bifencilcarboxaldehido (**BFCS3**) y el film que contiene TPP tienen menor módulo de Young que el film de quitosano precursor (4015 ± 168 y 3848 ± 355 MPa, respectivamente) y, es la muestra de quitosano de peso molecular medio **FCS6M** (2%), sumergido en MeOH previo a la medición (línea 6, Tabla 13), la que presenta el valor mínimo de módulo de Young (2218 ± 203).

Examinando los valores de TS y del módulo de Young presentados en la Tabla 13 y comparándolos con los datos publicados en la literatura pueden hacerse las siguientes consideraciones. En primer lugar, nuestros valores obtenidos para la resistencia a la tracción (TS) y para el % de deformación a la rotura (%EB) son menores (la mitad aprox.) que los valores determinados por Park et al.,¹⁷⁰ si bien éstos autores no indican valor del módulo de Young y el método de casting utilizado por ellos es el de secado a t.a. durante 48 h vs. 40 minutos en el método de microondas que nosotros utilizamos y la concentración en ácido acético de la disolución utilizada para formar el film de concentración doble a la utilizada por nosotros. De Britto y de Assis¹³³ obtienen valores de TS y módulo de Young inferiores a los obtenidos por nosotros y valores comparables en %EB utilizando un casting de secado a t. a. y una disolución precursora de concentración al 1% en ácido acético y no indican el peso molecular del quitosano utilizado. Los valores publicados recientemente por Leceta et al.,¹⁷¹ para films de

¹⁷⁰ Park, S.Y.; Marsh K.S.; Rhim J.W. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 194-197.

¹⁷¹ Leceta, I.; Guerrero, P.; K. De la Caba, K., *Carbohydr. Polym.* **2013**, *93*, 339–346.

quitosanos de alto y bajo peso molecular son comparables a los obtenidos por nosotros en lo que a TS se refiere, y mayores en el % de deformación en la rotura (%EB) del film aunque estos autores utilizaron la técnica de casting a t. a., con el consecuente aumento del tiempo de obtención del film.

Para evaluar globalmente la aplicabilidad de un film es preciso valorar conjuntamente el % de deformación a la rotura (%EB), la resistencia a la tracción (TS) y el módulo de Young (E) (Tabla 13). En nuestro caso, podríamos concluir que en comparación con otros films de quitosano hasta ahora publicados, los que hemos preparado por irradiación con microondas son más resistentes (Módulo de Young = 3360-5129 MPa y TS = 45.5-61.7 MPa) y poseen mayor rigidez (%EB = 2.3-2.8). En el film **FCS3** (2%)-TPP y en el film modificado con bifenilcarboxaldehido (**BFCS3**) hay un ligero aumento en la elasticidad del material (menor módulo de Young) con respecto al film **FCS3**, aunque este aumento está acompañado por una reducción en la resistencia a la tracción y la deformación a la rotura (Tabla 13, líneas 2, 3 y 4). Por otro lado, el espesor en ambas muestras es ligeramente mayor (0.050 mm, 0.052 mm, respectivamente) en comparación con el del film **FCS3** (0.037 mm). El ligero aumento de la elasticidad del film **BFCS3** con respecto al **FCS3** podría deberse a la disminución en la cristalinidad, hecho que se ha descrito en base a patrones de difracción de rayos X (pico $2\theta = 10^0$) para algunas iminas derivadas de quitosano con respecto al quitosano de partida.^{75,172} Esta disminución de la cristalinidad facilitaría el movimiento de una cadena de quitosano con respecto a otra.

¹⁷² Sashikala, S; Syed, S. *Der Pharm Lett.* **2014**, 6, 90-97.

En general, con los valores que hemos obtenido de los tres parámetros mencionados, nuestros materiales se sitúan (TS = 35.6 - 61.7 MPa; E = 2.2 a 5.1 GPa; %EB = 1.2 - 7.2) entre los valores del poliestireno de alto impacto y el PVC (**Tabla 14**, líneas 6 y 9, repectivamente) (línea 9). En particular, si se tiene en cuenta el valor obtenido de la resistencia a la tracción (TS), nuestros films **FCS3** y **FCS6** se encuentran según Crompton,¹⁷³ en el rango de polímeros de muy buena fuerza de impacto (TS = 60 – 100 MPa).

Tabla 14. Propiedades mecánicas de algunos materiales.^{15,16,174} ;

¹⁷³ Crompton, T.R. Mechanical Properties of Polymers. En *Physical Testing of Plastics* Smithers Rapra Technology 2012, pp 1-13.

¹⁷⁴ Davis, J.R. Tensile testing for Determining Sheet Formability. *Tensile Testing*; 2nd edition. ASM International: Ohio, 2004; pp 101-117.

Material	Resistencia a la tracción (TS) (MPa)	Módulo de Young (E) (GPa)	Deformación a la rotura (%EB)
Elastómero de Poliuretano termoplástico	24	0.003	700
Polietileno de baja densidad (LDPE)	10	0.25	400
Polietileno de alta densidad (HDPE)	32	1.25	150
Acetato de celulosa	30	1.7	60
Polipropileno (PP)	26	2.0	80
Poliestireno de alto impacto	42	2.1	2.5
Policarbonato	50	2.1	200
Tereftalato de polietileno	55	2.3	300
Cloruro de polivinilo (PVC)	58	3.1	30
Silicona	28	3.5	2
Poliéster (electric)	40	9.0	2
Hueso Cortical ¹⁷⁵	96	21.0	0.7
Aluminio 3003-O ¹⁷⁶	69	48.0	-
Titanio grado 1 ¹⁷⁷	240	102.7	24
Esmalte dental ^{178, 179}	62	80	-
Acero inoxidable 301	215	690.0	70

*Visualización de la morfología de los films de quitosano y del film **BFCS3** en el microscopio confocal y el microscopio electrónico de barrido.*

¹⁷⁵ Bayraktara, H. H.; Morgana, E. F.; Niebur, G. L.; Morriss, G. E.; Wonga, E. K.; Keavenya, T. M. *J. Biomech.* **2004**, *37*, 27–35.

¹⁷⁶ Davis, J. R. *Metals Handbook*. Desk Edition. ASM. 1998, pp 153-173.

¹⁷⁷ Niinomi, M. *Mat. Sci. Eng. A.* **1998**, *243*, 231–236.

¹⁷⁸ M. Staines, M.; W. H. Robinson, W. H. and Hood, J.A. *J Mater. Sci.* **1981**, *16*, 2551–2556.

¹⁷⁹ Giannini, M.; Soares C. J.; De Carvalho, R. M. *Dental Material.* **2004**, *20*, 322–329.

En la Figura 50 se muestra una imagen de una superficie de 2.31 mm^2 del film preparado a partir de quitosano y bifenilcarboxialdehido (**BFCS3**) obtenida mediante una exploración superficial 3D con el microscópio confocal (a), en comparación con una membrana de diálisis con corte de $12000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (b). Se observa la morfología de la superficie del film **BFCS3** en escala micrométrica mediante un rango de colores que oscila en torno a $40 \mu\text{m}$ sobre y debajo del plano. A diferencia de la membrana de diálisis que presenta poros ($7 \mu\text{m}$ de diámetro), el film no presenta poros a esta escala, igual que se estableció la ausencia de poros para otros films de quitosano utilizando el microscopio electrónico de barrido (Figura 51). Esto demuestra que las condiciones de secado empleadas han sido las apropiadas para obtener una superficie sin porosidades.

Morfológicamente se pueden hacer varias observaciones basadas en las imágenes adquiridas en el SEM (Figura 50). Por un lado, se observa una superficie más lisa para el film **FCS3** (b) que para el **FCS6** (a), el **FCS1** (c) o el film **BFCS3** (d). La concentración idónea para la preparación de los films es una solución de quitosano al 2% (m/v) en CH_3COOH 1% ac., ya que si se emplean concentraciones más altas, aparece sobre la superficie del film materia insoluble [Figura 50 (e)] que, debido a la viscosidad de la solución es difícil de filtrar previo al proceso de secado. Por último, se observa un ordenamiento estructural en el sólido **CS3** (e) y un aspecto estructural estratificado en el compuesto **10** (f), que puede reflejar la menor cristalinidad de este compuesto, como se ha mencionado previamente, y por analogía la consiguiente menor rigidez de los films **BFCS3**.

a)



b)

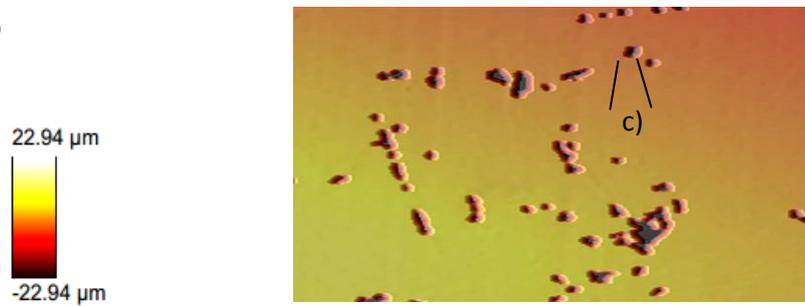


Figura 50 Imagen al microscopio confocal del film **BFCS3**: (a) en comparación con una membrana de diálisis (Sigma Aldrich) con corte de $12000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (b) en la que se muestra un poro con diámetro de $7 \mu\text{m}$ (c).¹

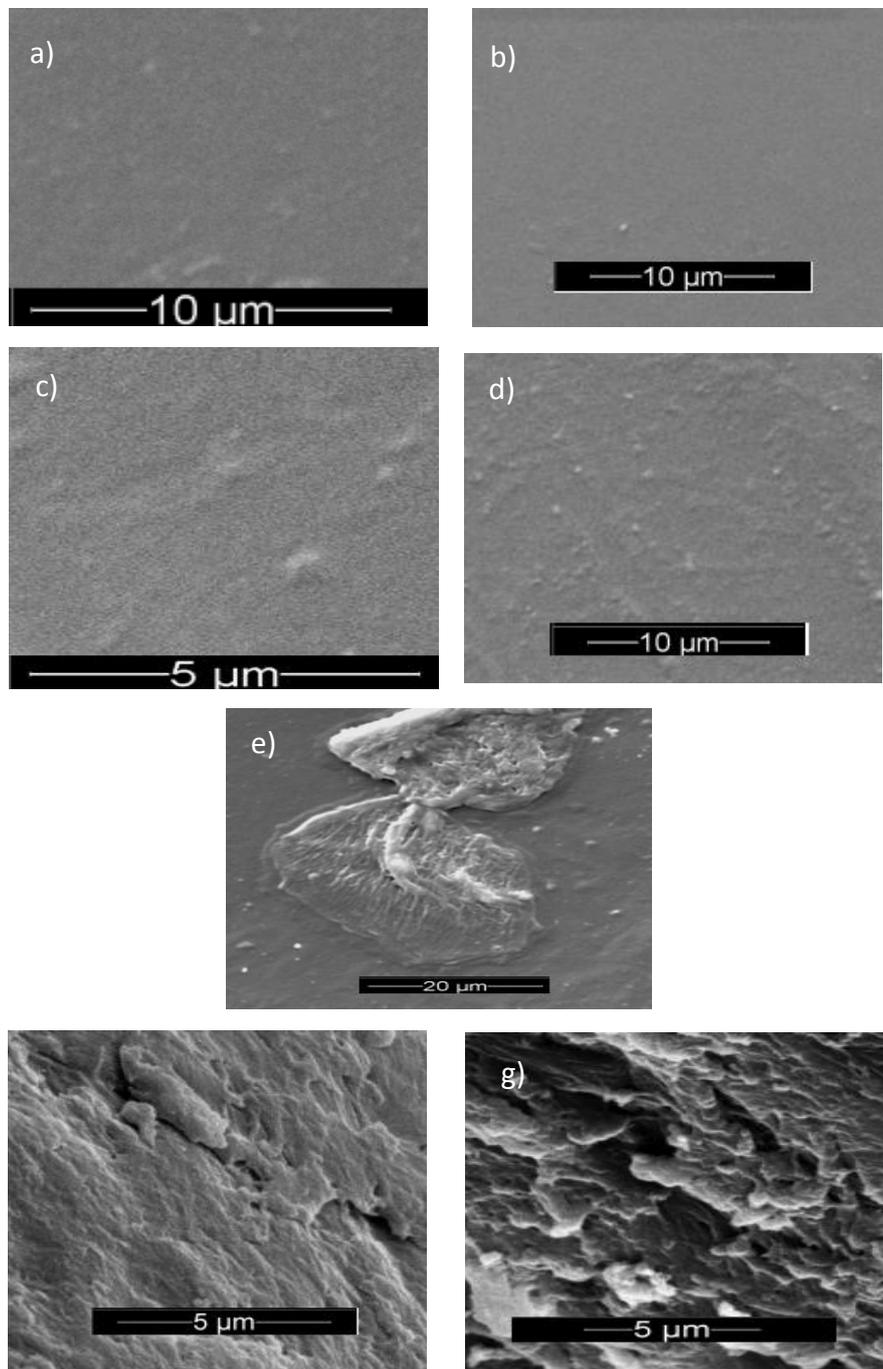


Figura 51 Imagen al microscopio electrónico de barrido de: (a) Film de quitosano **FCS6** (2 % m/v), (b) Film de quitosano **FCS3** (2 % m/v), (c) film de **FCS1** (2 %

m/v), (d) film de quitosano **BFCS3** (2 % m/v), (e) film de quitosano **FCS3** (2.5 % m/v) (f) quitosano **CS3** sólido, (g) *N*-(4-fenilbenciliden)-quitosano (Compuesto **10**).

Tomando en consideración los valores de las propiedades mecánicas obtenidas para los films preparados y sus aspectos morfológicos, podemos atribuirles el potencial para su utilización en el envasado activo rígido y como biomateriales potenciales para impresión en 3D, tratándose además de materiales biodegradables y sin porosidades,¹⁸⁰ con propiedades antimicrobianas,

¹⁸⁰ López-Rubio, A.; Almenar, E.; Hernandez-Muñoz P.; Lagarón, J. M.; Catalá R.; Gavara, R. *Food. Rev. Int.* **2004**, *20*, 357-387

6.2 Actividad Antimicrobiana de Quitosano y Derivados de Quitosano

6.2.1 Antecedentes

Una de las propiedades importantes del quitosano es su actividad antibacteriana. Se han descrito distintos mecanismos sobre la forma en que dicha actividad antibacteriana ocurre. Uno de estos mecanismos es el de la perturbación de la membrana celular bacteriana: el quitosano cargado positivamente, puede interactuar con componentes aniónicos de las membranas bacterianas (ácidos teicóicos), incluso compitiendo con el Ca^{2+} por dichos sitios de unión,¹⁸¹ y por tanto cambiar su permeabilidad, causando la salida de sustancias intracelulares,¹⁸² y afectando al crecimiento y viabilidad de las bacterias. Debido a que las bacterias Gram negativas (Figura 52) tienen una membrana externa doble, ésto le podría dar menor susceptibilidad a efectos de la disrupción de superficie que en las bacterias Gram positivas. En esta línea, se ha documentado en algunos casos mayor actividad antimicrobiana con bacterias Gram positivas que con Gram negativas.^{183,184} Un segundo mecanismo es a través de la capacidad quelante del quitosano con varios iones metálicos (Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} y

¹⁸¹ Young, D. H.; Kauss, H. *Plant Physiol.* **1983**, *73*, 698-702.

¹⁸² Tang, H.; Zhang, P.; Kieft, T. L.; Ryan, S. J.; Baker, S. M.; Wiesmann, W. P.; Snezna, R. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 2562–2571.

¹⁸³ Qi, L.; Xu, Z.; Jiang X.; Hu, C.; Zou, X. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2693–2700.

¹⁸⁴ Zhong, Z. M.; Xing, R. G.; Liu, S.; Wang, L.; Cai, S. B.; Li, P. C. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 566-570.

Cu^{2+}) en condiciones ácidas.¹⁸⁵ Los iones metálicos que se combinan con las moléculas de la pared celular microbiana son importantes para la estabilidad de la membrana celular y esta actividad quelante del quitosano interferiría con dicha estabilidad. También se ha descrito la capacidad quelante del quitosano no sólo en condiciones ácidas sino también en condiciones neutras con iones metálicos divalentes.¹⁸⁶

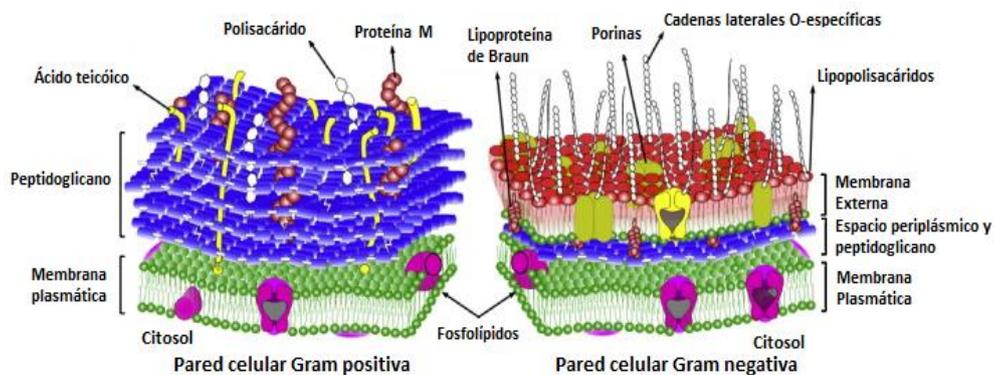


Figura 52. Esquema de la composición de la membrana celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas

Un tercer mecanismo de acción antimicrobiana del quitosano es a través de su posible interacción con el ADN de la bacteria que induce la inhibición de la síntesis proteica y del ARNm, a través de la entrada del quitosano al núcleo del microorganismo.¹⁸⁷

¹⁸⁵ Kong, M.; Chen, G. X.; Xing, K.; Park, H. J. *Int J. Food Microbiol.* **2010**, *144*, 51–63.

¹⁸⁶ Kong, M.; Chen, X.G.; Liu, C. S.; Yu, L. J.; Ji, Q. X.; Xue, Y. P.; Cha, D. S.; Park, H. J. *Front. Mat. Sci. China* **2008**, *2*, 214–220.

¹⁸⁷ Goy, R. C.; De Britto, D.; Assis, O. B. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* **2009**, *19*, 241-247.

El análisis de la respuesta transcripcional por la aplicación del quitosano en bacterias se ha estudiado en *Staphylococcus aureus* SG511 y se ha encontrado que el tratamiento con quitosano conlleva múltiples cambios en la expresión de genes involucrados en la regulación del estrés y la autólisis, así como el de genes asociados con el metabolismo de energía, como el que codifica el formato acetiltransferasa (*pflB*) y su enzima activadora (*pflA*), respuesta típica de la bacteria a condiciones anaeróbicas.¹⁸⁸

Se han sintetizado derivados y complejos de quitosano para mejorar su actividad antimicrobiana. Por ejemplo, se han obtenido derivados *N*-acilados de quitosano¹⁸⁹ o complejos con el ácido tioglicólico¹⁹⁰ con mayor actividad antimicrobiana que el quitosano de partida. Por otro lado, para mejorar la compatibilidad del quitosano y realizar pruebas antimicrobianas a pH fisiológico, se han cuaternizado tanto el quitosano como algunos de sus derivados, observándose un incremento de la acción antibacteriana.^{191,192} Se atribuye dicho efecto a que la introducción de carga permanente mejora la interacción con las moléculas cargadas negativamente de la pared celular. Por otro lado, el efecto sinérgico del quitosano en complejos con otras sustancias (Ag, ZnO) también puede incrementar la acción antibacteriana.

¹⁸⁸ Raafat, D.; Von Bargen, K.; Haas, A.; Sahl, H. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 3764–3773.

¹⁸⁹ Hu, Y.; Du, Y.; Yang, J.; Tang, Y.; Li, J.; Wang, X. *Polym.* **2007**, *48*, 3098–3106.

¹⁹⁰ Geisberger, G.; Gyenge, E. B.; Hinger, D.; Maake, K. C.; Patzke, G. R. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1010–1017.

¹⁹¹ Martins, A. F.; Facchi, S. P.; Follmann, H. D.; Pereira, A. G.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 20800–20832.

¹⁹² Vallapa, N.; Wiarachai, O.; Thongchul, N.; Pan, J.; Tangpasuthadol, V.; Kiatkamjornwong, S.; Hoven, V.P. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 868–875.

Por ejemplo, el ZnO produce especies reactivas de oxígeno (ROS),¹⁹³ pero el mecanismo de producción de ellas requiere humedad, que es captada con ayuda del quitosano.¹⁹⁴ Se ha descrito también la posibilidad de mayor actividad antimicrobiana de nanopartículas de quitosano que del quitosano de partida dependiendo de las características específicas de la nanopartícula (en particular su potencial zeta).¹⁰

La actividad antimicrobiana se ha testado, no sólo utilizando soluciones de quitosano o derivados líquidos sobre agar o cultivos bacterianos, sino sobre tejidos, alimentos, frutas¹⁹⁵ e incluso sobre utensilios utilizados en la práctica médica y también sobre films.¹⁹⁶ Este último está relacionado con la aplicación potencial del quitosano en el envasado activo, al tener actividad antimicrobiana sobre microorganismos causantes de la contaminación y el deterioro de los alimentos.^{197,198}

Por último, la actividad antimicrobiana del quitosano está influenciada por factores intrínsecos y extrínsecos tales como el grado de polimerización, el peso molecular, la composición química del medio de crecimiento, las condiciones ambientales y el tipo de disolvente utilizado para disolver el quitosano o el derivado.⁵

¹⁹³ Y. Xie, Y. He, P. L. Irwin, T. Jin and X. Shi. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 2325–2331.

¹⁹⁴ Perelshtein, L.; Ruderman, E.; Perkash, N.; Tzanov, T.; Beddow, J.; Joyce, E. Timothy J. Mason, T. J.; Blanes, M. *J. Mater. Chem. B.* **2013**, *1*, 1968-1976.

¹⁹⁵ Meyers, S. P.; Prinyawiwatkul, W.; Xu, Z. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, 5, 87-100.

¹⁹⁶ Rodríguez-Núñez, J. R.; López-Cervantes, J.; Sánchez-Machado, D. I.; Ramírez-Wong, B.; Torres-Chavez, P.; Cortéz-Rocha, M. O. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2012**, *47*, 2127–2133

¹⁹⁷ Seydim A.; Sarikus, G. *Food Res. Int.* **2006**, *39*, 639-644.

¹⁹⁸ Mastromatteo, M.; Mastromatteo M.; Conte A; Del Nobile, MA. *Trends Food Sci. Tech.* **2010**, *21*, 591-598.

6.2.2 Resultados y Discusión

6.2.2.1 Actividad antimicrobiana en disolución.

Se procedió a determinar la actividad antimicrobiana del quitosano de distintos pesos moleculares y grados de desacetilación y de aminas secundarias derivadas de quitosano sobre las bacterias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhimurium*.

El % de inhibición o reducción bacteriana (R) se calculó utilizando la fórmula $R = 100 \times (C-A)/C$,¹⁹⁹ en el que C es el número de bacterias del experimento control y A es el número de bacterias en las placas tratadas con quitosano o con aminas secundarias derivadas de quitosano.

En la Figura 53 se muestran los valores del % de inhibición del quitosano y aminas secundarias derivadas de quitosano, preparados a una concentración de 0.03% (m/V), sobre *Escherichia coli*. La amina derivada de quitosano **18** y el quitosano **CS1** inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli* al 100%. Los derivados **16** y **18** tuvieron mayor actividad que el quitosano **CS3** de M_w similar al quitosano de partida utilizado (98.0%, 100%, 90.0%, respectivamente). El compuesto **17** tuvo una actividad antibacteriana similar al quitosano **CS3** y mayor actividad antimicrobiana que el derivado **19** (60.6%). Comparando el efecto de los distintos quitosanos en el % de inhibición del crecimiento sobre *Escherichia coli*, se observa que éste disminuye a medida que aumenta el peso molecular (**CS1**>**CS3**>**CS6**; 100%, 90.0%, 71.2%, respectivamente).

¹⁹⁹ Seong, H.; Whang, H. S.; KO, S. J. *Appl. Polym. Sci.* **2000**, 76, 2009-2015.

En la Figura 54 se muestran los valores del % de inhibición del quitosano y aminos secundarios derivados de quitosano, preparados a una concentración de 0.05% (m/V), sobre *Klebsiella pneumoniae*. Entre estas aminos secundarios de quitosano, el compuesto **18** presentó mayor inhibición (97.2%) que los derivados **16**, **17** y **19**, con % de inhibición de 92.5%, 88.4% y 70.4%, respectivamente. Los derivados **16**, **17**, **18** tuvieron mayor actividad que el quitosano **CS3** de M_w similar al quitosano de partida utilizado para su síntesis (**CS5**). El compuesto **19** tuvo una actividad antibacteriana similar al quitosano **CS1** (70.4% y 68.2 %, respectivamente).

Comparando el efecto de los distintos quitosanos en el % de inhibición del crecimiento sobre *Klebsiella pneumoniae* se observa que éste aumenta conforme aumenta el peso molecular (**CS1**<**CS3**<**CS6**; 68.2%, 77.6%, 100%, respectivamente).

En la Figura 55 se muestran los valores del % de inhibición del quitosano y aminos secundarios derivados de quitosano, preparados a una concentración de 0.1% (m/V), sobre *Salmonella typhimurium*. El amino derivado de quitosano **16** y el quitosano **CS1** inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli* al 100%. Los derivados **16**, **17** y **18** tuvieron mayor actividad que el quitosano **CS3** de M_w similar al quitosano de partida (100%, 92.6%, 95.1%, 88.6%, respectivamente) y que el quitosano **CS6** (76.7%). El compuesto **19** fue el que presentó menor % de inhibición del crecimiento sobre *Salmonella typhimurium*.

Comparando el efecto de los distintos quitosanos en el % de inhibición del crecimiento sobre *Salmonella typhimurium*, se observa que éste disminuye a medida que aumenta el peso molecular (**CS1**>**CS3**> **CS6**; 100%, 88.6%, 76.7%, respectivamente).

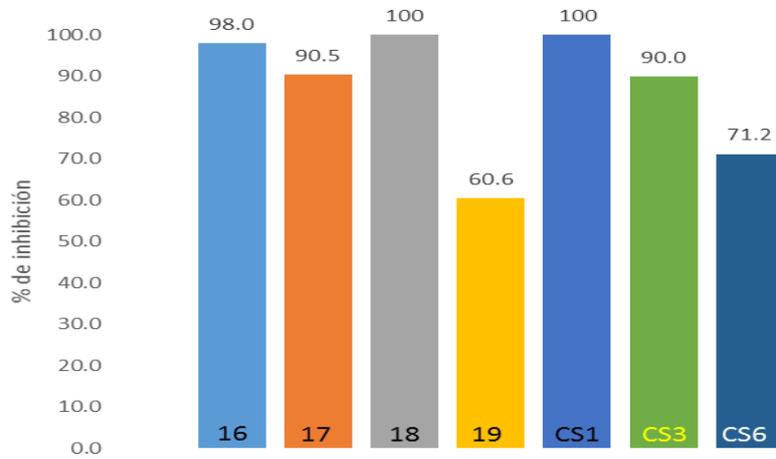


Figura 53 Actividad antimicrobiana del quitosano y derivados a una concentración de 0.03% (m/V) sobre *Escherichia coli*.

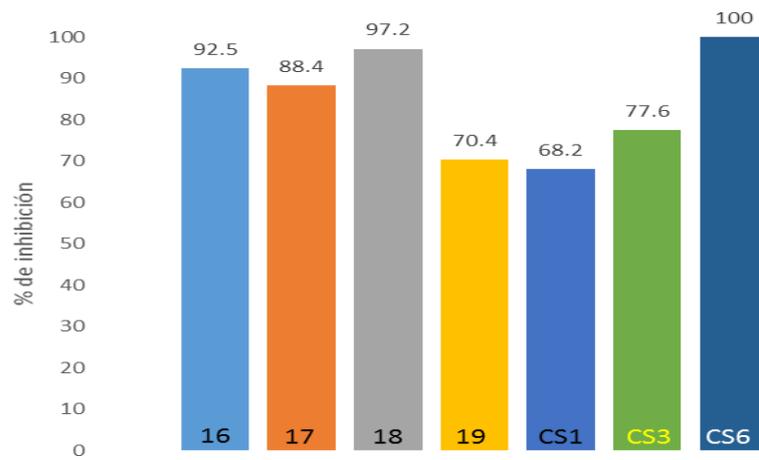


Figura 54 Actividad antimicrobiana del quitosano y derivados de quitosano a una concentración de 0.05% (m/V) sobre *Klebsiella pneumoniae*.

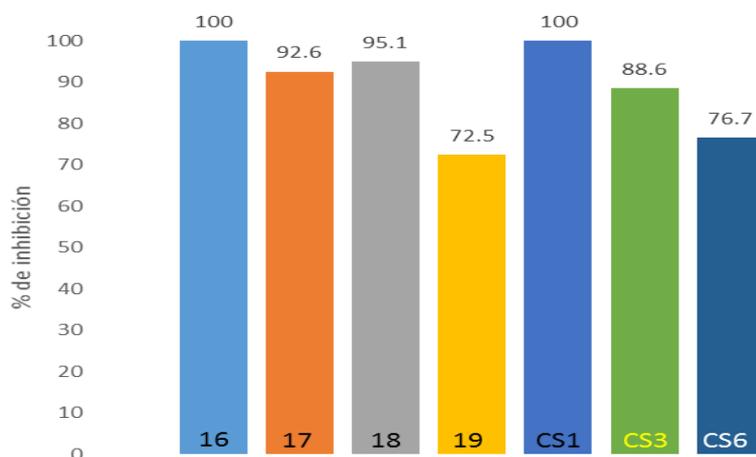


Figura 55. Actividad antimicrobiana del quitosano y de derivados de quitosano a una concentración de 0.1% (m/V) sobre *Salmonella typhimurium*.

Se observó tanto para *Escherichia coli* como para *Salmonella typhimurium* mayor actividad antibacteriana a menor peso molecular del quitosano. Este efecto antibacteriano incrementado a menor peso molecular se ha descrito previamente para éstas y otras bacterias Gram negativas,²⁰⁰ como consecuencia de la mayor movilidad, atracción e interacción iónica de las cadenas de menor tamaño que favorecen la adopción de una conformación extendida y en una unión efectiva del polímero a la superficie de la membrana.⁸ Por otro lado, se observó mayor actividad antibacteriana a mayor peso molecular del quitosano en *Klebsiella pneumoniae*, efecto que se ha descrito más comúnmente para bacterias Gram positivas (p. ej. *S. aureus*).²⁰¹ Esta diferencia de efecto del peso molecular del quitosano implica un mecanismo de acción diferente. En un estudio se encontró que tanto en *Staphylococcus aureus* como en *Klebsiella pneumoniae* el

²⁰⁰ Zheng, L.; Zhu, J. *Carbohydr. Polym.* **2003**, *54*, 527–530.

²⁰¹ Younes, I.; Sellimia, S.; Rinaudo, M.; Jellouli, K.; Nasri, M. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *185*, 57–63.

quitosano induce tanto la agregación de las células bacterianas como la desorganización de la pared celular, lo que conduce a la liberación del contenido bacteriano hacia el ambiente.²⁰²

Los valores de inhibición bacteriana y de concentración mínima inhibitoria (MIC) de los quitosanos utilizados se encuentran dentro de los rangos descritos para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhimurium* [valores MIC de 0.002 a 0.1% (m/V), 0.01 a 0.1 (m/V), > 0.1% (m/V), respectivamente].⁸ Sin embargo, a diferencia de lo descrito por Lim y Hudson,¹³⁸ en *Escherichia coli* no se observó que el aumento de la concentración del quitosano o de derivados de quitosano disminuyera la actividad antimicrobiana de las muestras utilizadas, ya que nosotros constatamos que concentraciones mayores (0.5% m/V) inhibieron totalmente el crecimiento de esta bacteria.

Los derivados **16**, **17**, **18** presentaron en la mayor parte de los casos una actividad antimicrobiana mayor o igual que los quitosanos. La actividad antimicrobiana del derivado **19** fue la menor de todos los derivados, posiblemente por la combinación de factores como pH, que la unidad introducida no tenga actividad antimicrobiana, o que su grado de sustitución sea más alto que el ideal para tener una actividad antimicrobiana óptima. Se ha descrito en algunos casos que el incremento del grado de sustitución puede disminuir la actividad antimicrobiana del derivado de quitosano.^{7,203} Hu et al.⁷ describen la importancia de la interacción entre las unidades acopladas al quitosano en la formación de los agregados intramoleculares y

²⁰² Didenko, L. V.; Gerasimenko, D. V.; Konstantinova, N. D.; Silkina, T. A.; Avdienko, I. D.; Bannikova, G. E.; Varlamov, V. P. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2005**, *140*, 356-60.

²⁰³ Sajomsang, W.; Tantayanon, S.; Tangpasuthadol, V.; Daly, W. H. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 2502–2511.

entrecruzamientos lo que influye en la superficie de contacto de las cargas positivas del quitosano con las membranas de las bacterias y por ende en la actividad antimicrobiana de derivados *N*-acilados. La interacción óptima entre dichas unidades introducidas serían dependientes tanto del grado de sustitución del derivado como del tipo de unidad acoplada al quitosano y por tanto explicarían los resultados de menor actividad antimicrobiana del derivado **19**. Si bien se ha descrito que la presencia de nitrógenos adicionales al grupo amino del quitosano puede incrementar la actividad antimicrobiana del derivado de quitosano,¹⁸² se ha referido que la introducción de la unidad *N*-piridilmetil o la unidad *N,N*-dimetilaminobencil al quitosano no le confiere actividad antimicrobiana.⁷¹

6.2.2.2 *Actividad antimicrobiana en Films y Sólidos*

Se observó inicialmente que los films **FCS1**, **FCS3** y **FCS6** sin neutralizar se degradaban total o parcialmente al estar en contacto durante varias horas con el agar, por lo que se emplearon films neutralizados con NaOH 0.1M para realizar los ensayos antibacteriales. El film del derivado **BFCS3** (FCS3 y 4-bifenilcarboxaldehído) no se degradó en el agar por lo que su actividad antibacterial se pudo estudiar tanto como con el film neutralizado como del film no neutralizado.

Se observó que todos los films estudiados (**FCS1**, **FCS3**, **FCS6** y **BFCS3**) mantuvieron su consistencia y no eran degradados por las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhimurium* tras 24 horas de contacto con los agares inoculados con las bacterias. En *Escherichia coli* todos los films estudiados inhibían el crecimiento bacteriano en el punto de contacto del film con el agar, sin presentar halo de

inhibición. De igual modo se observó en *Klebsiella pneumoniae* que los films **FCS3**, **FCS6**, y **BFCS3** inhibían el crecimiento bacteriano en el punto de contacto del film con el agar sin halo de inhibición, observándose sólo crecimiento bacteriano parcial en el caso del film **FCS1**. Los films **FCS1**, **FCS3** y **BFCS3** inhibieron el crecimiento bacteriano en el punto de contacto del film con el agar inoculado con *Salmonella typhimurium*, sin presentar halo de inhibición bacteriana, mientras que en el film **FCS6** sólo se observó crecimiento bacteriano parcial.

Como se ha descrito en el párrafo anterior ninguno de los films preparados presentó halo de inhibición del crecimiento bacteriano. Para que se observe este fenómeno se requiere la migración o difusión de sustancias con propiedades antimicrobianas desde el punto de contacto de dicha sustancia con el agar. Este proceso comúnmente se debe no al quitosano como film sino a ciertas sustancias (p. ej. aceites esenciales) agregadas al quitosano, como en las cubiertas comestibles de quitosano.^{204,205}

El film **BFCS3** neutralizado y no neutralizado presentó actividad antimicrobiana en el punto de contacto con el agar frente a las tres bacterias empleadas. Su hidrofobicidad podría dar lugar a una reducción en la permeabilidad al vapor de H₂O en comparación con los otros films preparados.

Los resultados cualitativos de la actividad antimicrobiana de muestras de quitosano y derivados en estado sólido se muestran en la Tabla 15. En

²⁰⁴ Azevedo, A. N.; Buarque, P. R.; Cruz, E. M.; Blank, A. F.; Alves, P. B.; Nuñez, M. L.; De Aquino, S. L. *Food Control*. **2014**, *43*, 1-9.

²⁰⁵ Perdonés, A.; Sánchez-González, L.; Chiralt, A.; Vargas, M. *Postharvest Biol. Tec.* **2012**, *70*, 32–41.

Escherichia coli, cuando se inoculan aprox. 2 mg de las muestras sólidas a evaluar en caldo nutritivo no se observó crecimiento bacteriano para las muestras sólidas de los compuestos **16**, **17**, **18**, **CS3** y **CS6**. En cambio, sí se observó crecimiento bacteriano para los compuestos **19** y **CS1**. Al mismo tiempo, estos últimos sólidos adquirieron una coloración amarilla, reflejo del crecimiento bacteriano sobre la muestra sólida. En *Klebsiella pneumoniae*, no se observó crecimiento bacteriano para las muestras sólidas **16** y **CS6**, inoculadas sobre el agar nutritivo, pero sí se observó crecimiento bacteriano para los compuestos **17**, **18**, **19**, **CS1**, y **CS3** cuando se inoculan aprox 2 mg de estas muestras en caldo nutritivo. En *Salmonella typhimurium*, las muestras **16**, **18** y **CS1** inhibieron el crecimiento bacteriano, mientras que se observó crecimiento bacteriano en las muestras **17**, **19**, **CS3** y **CS6**.

Tabla 15. Actividad antimicrobiana de quitosanos y derivados sólidos depositados sobre la superficie del agar nutritivo.

Muestra	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhimurium</i>
16	+	+	+
17	+	-	-
18	+	-	+
19	-	-	-
CS1	-	-	+
CS3	+	-	-
CS6	+	+	-

En *Escherichia coli* se observó que entre los distintos quitosanos utilizados fueron **CS3** y **CS6** los que presentaron actividad antibacteriana en estado sólido. Este resultado es diferente al obtenido utilizando quitosanos en disolución donde se observó la mayor actividad antimicrobiana al menor

peso molecular del quitosano empleado (**CS1**). En *Klebsiella pneumoniae*, el quitosano de mayor peso molecular presentó mayor actividad antimicrobiana, mientras que en *Salmonella typhimurium* el de menor peso molecular (**CS1**) presentó mayor actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana en sólidos puede ser diferente a la actividad antimicrobiana en disolución debido a que en sólidos, aspectos como la superficie de contacto con las bacterias y la morfología del sólido adquieren importancia en la actividad antibacteriana del quitosano.⁶

Dado que las bacterias de mayor relevancia en cuanto a enfermedades por contaminación alimentaria son *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, los quitosanos de mayor interés son los de menor peso molecular, según se desprende del estudio que hemos realizado. En conclusión, podríamos decir que tenemos dos compuestos interesantes en términos de aplicabilidad: **CS1** en disolución, que presenta la máxima capacidad de inhibición frente a ambas bacterias y la amina secundaria derivada de quitosano de estructura **16** que, tanto en estado sólido como si es un film (neutralizado o sin neutralizar) presenta actividad antibacteriana sobre los tres tipos de bacterias analizados, y en disolución presenta valores muy elevados del % de inhibición en todos los casos (100, 98.0 y 92.5, para *S. typhimurium*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, respectivamente).

6.3 Formación de nanopartículas y geles de quitosano y sus derivados

6.3.1 Antecedentes

El desarrollo de la nanotecnología ha permitido la obtención de materiales de tamaños nanométricos con propiedades físicas y químicas diferentes a las del material a escala macroscópica.²⁰⁶ Esto ha abierto un campo amplísimo de aplicaciones tecnológicas y farmacéuticas para las estructuras de estas dimensiones.²⁰⁷ Las nanoestructuras con potencial aplicación tecnológica y farmacéutica incluyen en general liposomas, nanoesferas poliméricas, nanoemulsiones, micelas poliméricas, hidrogeles, y nanopartículas sólidas. Estas últimas son una forma de presentación de una molécula o complejo orgánico, inorgánico o híbrido, generalmente ≤ 100 nm, que dependiendo de sus propiedades de carga, tamaño y los componentes que lo conforman, presenta distintas aplicaciones.²⁰⁸ Las nanopartículas poliméricas, incluyendo al quitosano, se han utilizado como vehículo preferido en la escala nano por su eficiencia endocítica, acceso más preciso a las dianas tumorales y por su alta eficiencia de encapsulación.²⁰⁹

²⁰⁶ Martín Gago, J. A.; Briones Llorente, C.; Casero Junquera, E.; Serena Domingo, P. A. *Nanociencia y nanotecnología. Entre la ciencia ficción del presente y la tecnología del futuro*. FECYT. Madrid 2008.

²⁰⁷ (a) Kumar, S. S. R. C. (Ed) *Biological and Pharmaceutical Nanomaterials*. Nanotechnologies for the Life Sciences, Book Series, Vol. 2, Wiley-VCH. Weinheim 2006. (b) Kumar, S. S. R. C.; Hormes, J.; Leuchner, C. (Ed) *Nanofabrication towards biomedical applications. Techniques, Tools, Applications, and Impact*. Wiley-VCH. Weinheim 2005.

²⁰⁸ De Jong, W. H.; Borm, P. J. A. *Int. J. Nanomedicine* **2008**, *3*, 133–149.

²⁰⁹ Malam, Y.; Loizidou, M.; Seifalian, A. M. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 592–599.

Se han preparado nanopartículas de quitosano y otros polímeros utilizando distintas estrategias como son el entrecruzamiento iónico,²¹⁰ covalente,²¹¹ preparación por coacervación,²¹² polimerización,²¹³ entrecruzamiento por emulsión,²¹⁴ spray drying²¹⁵ y método micelar.²¹⁶

De los diversos métodos de preparación de nanopartículas, el entrecruzamiento iónico presenta la ventaja, además de su sencillez, de que por su propiedad reversible puede en gran medida evitar la toxicidad potencial de los reactivos.²¹⁷ Uno de los agentes iónicos utilizados para la formación de nanopartículas que presenta ventajas sobre la utilización de agentes entrecruzantes covalentes monofuncionales o bifuncionales (glutaraldehído, genipina, glioxal, etilenglicol diglicidil éter)²¹¹ es el tripolifosfato de sodio (TPP), que fue introducido en el trabajo pionero de Calvo, et al.²¹⁸ (Figura 56). La preparación de nanopartículas de quitosano se realiza así de una forma relativamente rápida,^{217,219} de forma que el tamaño de las nanopartículas y el potencial zeta (ζ) obtenidos dependen de diversos

²¹⁰ Jin, S.; Feng, L.; Yu, X. *J. Control. Release* **2011**, *152*, e39–e41.

²¹¹ Anitha, A.; Rejinold, N. S.; Bumgardner, J. D.; Nair, S. V; Jayakumar, R. In *Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals*; John Wiley & Sons, Ltd, 2012; pp 107–124.

²¹² Li, G.-F.; Wang, J.-C.; Feng, X.-M.; Liu, Z.-D.; Jiang, C.-Y.; Yang, J.-D. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, *175*, 3244–3257.

²¹³ Krishna S. A.; Amareshwar, P. *Asian J Pharm Clin Res.* **2011**, *4*, 73-74.

²¹⁴ Phromsopha, T., Baimark, Y. *Biotechnology* 2010, *9*, 61-66.

²¹⁵ Feng, Z. Q.; Sun, C. G.; Zheng, Z. J.; Hu, Z. B.; Mu, D. Z.; Zhang, W. F. *Dry. Technol.* **2014**, *33*, 55–65.

²¹⁶ Kafshgari, M. H.; Khorram, M.; Mansouri, M.; Samimi, A.; Osfouri, S. *Iran. Polym. J.* **2012**, *21*, 99–107.

²¹⁷ Liu, H.; Gao, C. *Polym. Adv. Technol.* **2009**, *20*, 613–619.

²¹⁸ Calvo, P.; Remuñán-López, C.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *63*, 125–132.

²¹⁹ Fuenzalida, J. P.; Weikert, T.; Hoffmann, S.; Vila-Sanjurjo, C.; Moerschbacher, B. M.; Goycoolea, F. M.; Kolkenbrock, S. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 2532–2539.

factores físicos y químicos como son el grado de desacetilación del quitosano, concentración de quitosano y TPP, pH y concentración salina, entre otros.

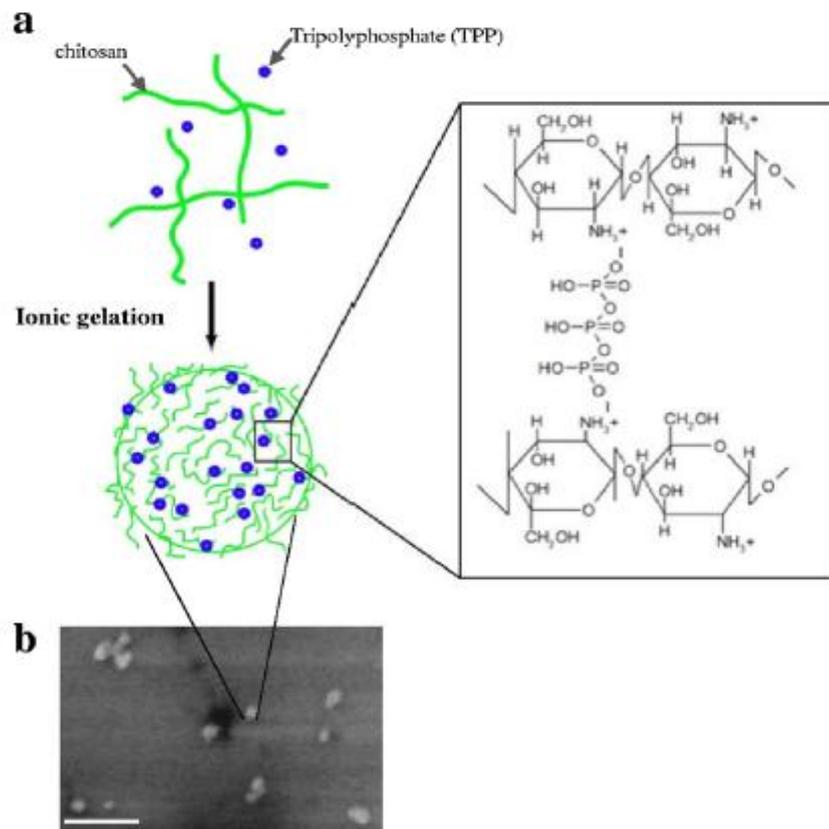


Figura 56. Formación del complejo quitosano-tripolifosfato por gelación ionotrópica. a) Ilustración esquemática del complejo quitosano-TPP y (b) imagen SEM, barra 200 nm.²²⁰

²²⁰ Shirotsaki, Y.; Tsuru, K.; Hayakawa, S.; Osaka, A.; Lopes, M. A.; Santos, J. D.; Fernandes, M. H. *Biomaterials* **2005**, 26, 485–493.

Tang, et al.²²¹ estudiaron la influencia de la concentración de quitosano, peso molecular y grado de desacetilación en la formación y características de nanopartículas preparadas a partir de quitosano y TPP. Las concentraciones iniciales de quitosano utilizadas por estos autores se encontraban entre 0.1% y 2.0% m/V, las concentraciones de TPP entre 0.02% y 0.2 % m/V. Observaron un incremento en el tamaño de las nanopartículas tanto a mayor peso molecular como a mayor concentración inicial del quitosano utilizado. Los tamaños de las nanopartículas oscilaban entre 100 nm y 400 nm. También observaron que a mayor pH (pH de 4.5 a 6.5) se reducía el tamaño de la nanopartícula, y lo explican considerando las distintas conformaciones del quitosano a distintos pH, con una conformación menos lineal a mayor pH lo que facilitaría la formación de nanopartículas y con tamaños más homogéneo. Además, estos autores encontraron que es mayor el tamaño de las nanopartículas a mayor grado de desacetilación, especialmente a concentraciones de quitosano mayores de 0.5% m/V.

Liu y Gao²¹⁷ estudiaron el efecto de distintos parámetros no sólo en el tamaño de las nanopartículas sino en el potencial zeta (ζ) y establecieron, además de los resultados mencionados anteriormente, que el aumento de la concentración de TPP, disminuye el valor de potencial zeta.

En cuanto a la citotoxicidad se ha descrito que las nanopartículas del derivado de quitosano *N*-(1-Cyanobenz[f]isoindole)Quitosano entrecruzado con TPP (**CBI-CS/TPP**) (citotoxicidad a 100 $\mu\text{g/mL}$) eran más citotóxicas que las del derivado **CBI-CS** (citotoxicidad a 1000 $\mu\text{g/mL}$).⁵² Según los

²²¹ Tang, Z. X.; Qian, J. Q.; Shi, L. E. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2007**, 136, 77-96.

autores, la diferencia en la citotoxicidad entre los polímeros **CBI-CS** y las nanopartículas **CBI-CS/TPP** es debida tanto al tamaño de partícula como a la relación superficie de carga/volumen, los cuales son parámetros claves que influyen en interacciones con membranas celulares (a través de atracciones electrostáticas y puentes de hidrógeno). Existe, sin embargo, otro estudio donde no se observó citotoxicidad de nanopartículas entrecruzadas con TPP sobre el mismo tipo de células.²¹⁷

La actividad antimicrobiana de nanopartículas de quitosano entrecruzadas con TPP fue estudiada en biofilms orales de *Streptococcus mutans*.²²² Estos biofilms se forman de manera natural en la superficie de dientes y se asocian a enfermedades como caries, gingivitis, y degradación del tejido periodontal.^{223,224} Las nanopartículas preparadas con quitosano de menor peso molecular tuvieron mayor actividad antimicrobiana sobre los biofilms de *Streptococcus mutans*, que las preparadas a partir del quitosano de mayor peso molecular.²²²

La mayor parte de los estudios sobre nanopartículas de quitosano o de derivados de quitosano están orientados a la administración de fármacos,²²⁵ oligonucleótidos y ADN de plásmido,²²⁶ proteínas,²²⁷ RNAsi²²⁸ y RNAs.²²⁹

²²² De Paz, L. E. C.; Resin, A.; Howard, K. a.; Sutherland, D. S.; Wejse, P. L. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 3892–3895.

²²³ Marsh, P. D. *Caries Res.* **2004**, *38*, 204–211.

²²⁴ Marsh, P. D. *J. Clin. Periodontol.* **2005**, *32*, 7–15.

²²⁵ Prego, C.; Goycoolea, F. In *Nanostructured Biomaterials for Overcoming Biological Barriers*, RSC Ed., London, U. K., 2012, pp 133-155.

²²⁶ Csaba, N.; Köping-Höggård, M.; Alonso, M. J. *Int. J. Pharm.* **2009**, *382*, 205–214.

²²⁷ Xu, Y.; Du, Y.. *Int. J. Pharm.* **2003**, *250*, 215–226.

²²⁸ Rojanarata, T.; Petchsangai, M.; Opanasopit, P.; Ngawhirunpat, T.; Ruktanonchai, U.; Sajomsang, S.; Tantayanon, S. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *70*, 207–214

Asimismo, se ha estudiado la vía de administración: oral²³⁰ nasal.²³¹, al colón,²³² y que atraviese la barrera hematoencefálica.

La encapsulación del eugenol en nanopartículas de quitosano-TPP mejora su estabilidad térmica y le da uso potencial como componente en bioplásticos.^{233,234} También se han encapsulado otras sustancias como veneno de serpiente,²³⁵ aceites esenciales de orégano²³⁶ y lisozima.

En un estudio reciente, Goycoolea y Kolenbrock²¹⁹ han demostrado que es posible localizar, seguir la degradación enzimática e incluso la interacción con cultivos celulares in vitro de nanopartículas de quitosano, y en particular de nanopartículas **CS-TPP**, mediante el marcado en superficie de las mismas con un biosensor fluorescente basado en una quitosanasasa a la que tras suprimir su actividad catalítica se ha fundido con una proteína verde fluorescente.

Se han preparado también nanopartículas **CS/TPP** fluorescentes por modificación, previo al entrecruzamiento con TPP, del quitosano, de forma

²²⁹ Wang, S.-L.; Yao, H.-H.; Guo, L.-L.; Dong, L.; Li, S.-G.; Gu, Y.-P.; Qin, Z.-H. *Cancer Genet. Cytogenet.* **2009**, *190*, 8–14.

²³⁰ Mansourpour, M.; Mahjub, R.; Amini, M.; Ostad, S.; Shamsa, E.; Rafiee-Tehrani, M.; Dorkoosh, F. *AAPS PharmSciTech* **2015**, 1–11.

²³¹ Pourshahab, P. S.; Gilani, K.; Moazeni, E.; Eslahi, H.; Fazeli, M. R.; Jamalifar, H. *J. Microencapsul.* **2011**, *28* (7), 605–613.

²³² Khatik, R.; Mishra, R.; Verma, A.; Dwivedi, P.; Kumar, V.; Gupta, V.; Paliwal, S. K.; Mishra, P. R.; Dwivedi, A. K. *J. Nanoparticle Res.* **2013**, *15*.

²³³ Woranuch, S.; Yoksan, R. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *96* (2), 578–585.

²³⁴ Vimal, S.; Abdul Majeed, S.; Taju, G.; Nambi, K. S. N.; Sundar Raj, N.; Madan, N.; Farook, M. a.; Rajkumar, T.; Gopinath, D.; Sahul Hameed, a. S. *Acta Trop.* **2013**, *128*, 486–493.

²³⁵ Mohammadpourounighi, N.; Behfar, A.; Ezabadi, A.; Zolfagharian, H.; Heydari, M. *Nanomedicine* **2010**, *6*, 137–143.

²³⁶ Hosseini, S. F.; Zandi, M.; Rezaei, M.; Farahmandghavi, F. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *95*, 50–56.

covalente utilizando el conjugado albumina-fluoresceína isotiocianato,^{237,238} trefeniletano,²³⁹ naftalen-2,3-dicarboxaldehído.⁵² En particular, las nanopartículas de *N*-(1-Cyanobenz[*f*]isoindole)Quitosano (**CBI-CS/TPP**), antes mencionadas, obtenidas a partir del producto de reacción de este último dialdehído con quitosano, exhiben menor intensidad de emisión de fluorescencia que las del derivado de quitosano sin entrecruzar con TPP (**CBI-CS**); siendo, además el rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_f) inversamente proporcional al DS y al peso molecular. Sin embargo, aunque la fluorescencia de las nanopartículas **CBI-CS/TPP** es más baja, dado su menor tamaño se internalizan mejor a través de la membrana celular y la imagen obtenida al microscopio confocal mostró fuerte fluorescencia sólo en aquellas células de fibroblasto donde había tenido lugar la entrada de la nanopartícula fluorescente entrecruzada **CBI-CS/TPP**, no las del derivado de quitosano sin TPP.⁵² Esto da aplicaciones potenciales a estas nanopartículas como nanomarcadores o nanorecubrimientos para la detección (sensing), representación óptica (imaging), o en la reparación del hueso.

Los llamados materiales sol-gel comprenden un amplio rango de sistemas inorgánicos e inorgánicos-orgánicos que tienen en común la estrategia o método de preparación. El proceso sol-gel implica la preparación de suspensiones coloidales (“sols”) que son convertidas a continuación en geles viscosos y de ahí a materiales sólidos. Los procesos

²³⁷ De Salamanca, A. E.; Diebold, Y.; Calonge, M.; García-Vazquez, C.; Callejo, S.; Vila, A.; Alonso, M. J. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2006**, *47*, 1416–1425.

²³⁸ Pandey, S.; Afrin, F.; Tripathi, R. P.; Gangenahalli, G. *J. Nanopharmaceutics Drug Deliv.* **2014**, *2*, 227–234.

²³⁹ Wang, Z.; Chen, S.; Lam, J. W. Y.; Qin, W.; Kwok, R. T.; Xie, K.; Hu, N.; Tang Q.; B. Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8238–8245.

sol-gel se utilizaron en principio para la construcción de materiales decorativos y se desarrollaron ampliamente en el siglo pasado para aplicaciones tales como vidrios, cerámicas, catalizadores, recubrimientos, composites y fibras. En la actualidad, se está consiguiendo desarrollar su enorme potencial que permite la preparación de nuevas generaciones de materiales avanzados no fácilmente accesibles por otros métodos, usando condiciones suaves y bajo consumo de energía.²⁴⁰

En general, el proceso de sol-gel pasa por las etapas de hidrólisis, condensación y polimerización de monómeros para formar cadenas y partículas, crecimiento de partículas, autoensamblado de las estructuras poliméricas, seguida por la formación de redes que se extienden a través del medio líquido, resultando el espesamiento de la solución lo que forma un gel.^{241,242} En la Figura 57 se describe la formación de una red orgánica-inorgánica que involucra todos estos procesos. Este concepto de sol-gel se aprovechó para la primera encapsulación de una proteína dentro de vidrios de sílica (Braun et al).²⁴³

²⁴⁰ Wright, J. D.; Sommerdijk, N. A. J. M. *Sol-Gel Materials. Chemistry and Applications*, CRC: Boca Raton, FL, 2001

²⁴¹ Bernard, T. N.; Van Bommel, M. J. J. *Sol-Gel Sci. Technol.* **1998**, *13*, 71–74.

²⁴² Yu, G.; Zhu, L.; Wang X.; Liu, J.; Xu, D. *Micropor. Mesopor. Mat.*; **2010**, *130*, 189-196.

²⁴³ S. Braun, S.; Rapportt, R.; Zusman, D.; Avnir, M.; Ottolenghi, *Mater. Lett.* **1990**, *10*, 1-5.

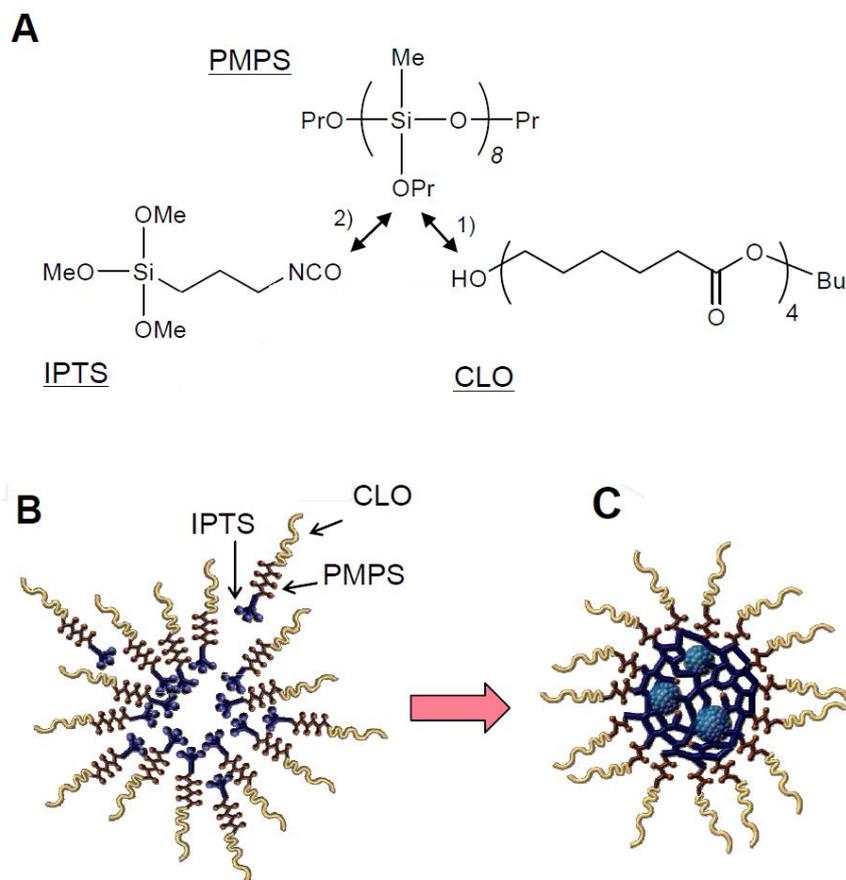


Figura 57. Preparación de organosiloxano con tres unidades (A) autoensamblado de nanopartículas de tres fases a través de agregación (B) y condensación de organosiloxano (C).²⁴⁴

El quitosano como polímero natural se ha usado para preparar una matriz sol-gel/quitosano para la inmovilización de enzimas.²⁴⁵ Se han utilizado diferentes agentes sililantes y entrecruzantes para generar los sistemas híbridos quitosano y siloxano como el tetraetoxisilano (TEOS),

²⁴⁴ Iji, M. En *The Delivery of Nanoparticles*; Abbass A. Hashim, Ed.; Rijeka, Croatia, 2012, Capítulo 22, pp 487–496.

²⁴⁵ Miao, Y.; Tan, S. N. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 437, 87–93.

tetrametoxisilano (TMOS), tetrakis(2-hidroxietil)ortosilicato (THEOS), γ -glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS), (3-amiloxipropil)dimetoximetilsilano (APDMOS), y 3-aminopropil trietoxisilano (APTES).²⁴⁶ Por otro lado, la reactividad entre el grupo amino y los epóxidos ofrecen una metodología simple y conveniente para la incorporación covalente de quitosano y enzimas en la red de siloxano. Utilizando GPTMS como agente sililante, Li et al.²⁴⁷ inmóvilizaron covalentemente in situ la peroxidasa de rábano rusticano en el quitosano como biosensor de H₂O₂.

Una de las aplicaciones más recientes de los sistemas híbridos siloxano-quitosano es en la regeneración nerviosa. Aunque las estrategias para la reparación nerviosa periférica ha mejorado en las últimas décadas, (p. ej. técnicas de microcirugía), la reparación funcional es usualmente incompleta.²⁴⁸ Los injertos son comúnmente usados para tratar los daños del nervio periférico causados por accidentes o enfermedades. Sin embargo, hay varias desventajas a este acercamiento.²⁴⁹ Como resultado de esto, se han hecho grandes esfuerzos por parte de por los investigadores y médicos para desarrollar terapias basadas en células y en ingeniería de tejido.²⁵⁰ Otra forma de inducir la reparación del nervio periférico es a través de las guías de tubo (tube guide) hechas de material polimérico (Figura 58). Estas guías deben ser biocompatibles, no tóxicas, biodegradables, permeables y no

²⁴⁶ Zou, H.; Wu, S.; Shen, J. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 3893–3957.

²⁴⁷ Li, F.; Chen, W.; Tang, C.; Zhang, S. *Talanta* **2009**, *77*, 1304–1308.

²⁴⁸ Shirotsaki, Y.; Hayakawa, S.; Osaka, A.; Lopes, M. a.; Santos, J. D.; Geuna, S.; Mauricio, A. C. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 153808, 1-7.

²⁴⁹ Matsuyama, T.; Mackay, M.; Midha, R.; *Neurologia Medico-Quirúrgica* **2000**, *40*, 187–199.

²⁵⁰ Hoke, A. *Nature Clinical Practice Neurology*, **2006**, *2*, 448–454.

inflamatorias como lo son otros scaffolds de ingeniería de tejidos. La microposidad del material es fundamental para que ocurra la revascularización así como la fuerza mecánica apropiada para mantener un apoyo estable para la regeneración del nervio durante el período de recuperación.²⁵¹ Se ha observado que las propiedades neuroregenerativas del quitosano-GPTMS poroso podrían deberse a su habilidad de promover la expresión de genes de mielina.

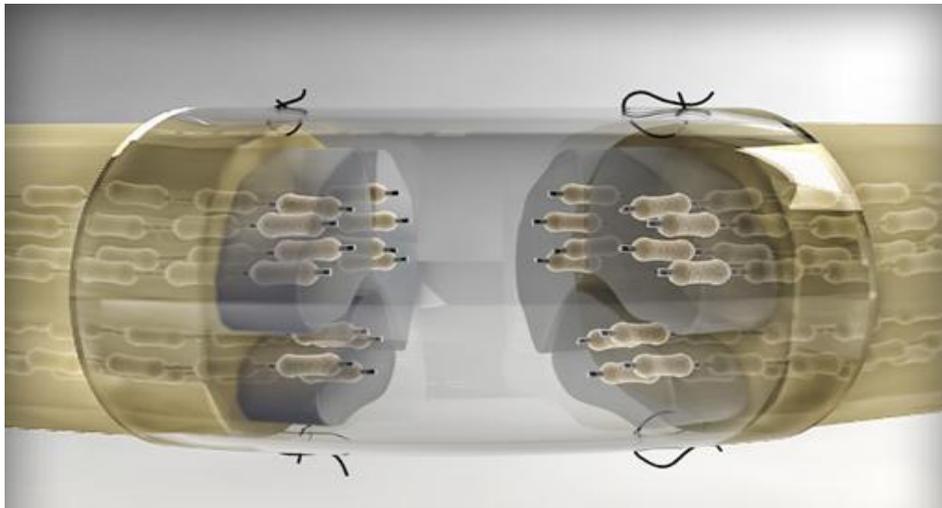


Figura 58. Regeneración del nervio periférico utilizando guías poliméricas.

6.3.2 Resultados y Discusión

²⁵¹ Huang Y.-C.; Huang, Y.-Y.; *Artificial Organs* **2006**, 30, 514–522.

6.3.2.1 Nanopartículas quitosano/TPP y nanopartículas fluorescentes cumarina-quitosano/TPP.

La investigación que se describe en este apartado y en el siguiente se han realizado en su mayor parte en el Institut de Chimie Moléculaire de Reims CNRS UMR de la Universidad de Reims (Francia) bajo la supervisión del Prof. Dr. Christophe Bliard.

Se prepararon diferentes soluciones de quitosano de partida **CS1** ($M_w = 42400 \text{ gmol}^{-1}$, DD = 87 %) a una concentración de 0.1 % m/V en CH_3COOH (1% m/V) y soluciones de 0.1 % TPP en CH_3COOH (1% m/V) para obtener diferentes proporciones de quitosano:TPP como se muestra en la Tabla 16. Con el incremento de la proporción de TPP el tamaño de las partículas disminuye progresivamente de 797 nm (relación 50:1 quitosano:TPP) a 187 nm (relación 2:1 quitosano:TPP). En la relación de quitosano:TPP (2:1) se observa un segundo pico de menor intensidad a 37 nm (Figura 59). Por otro lado, con el aumento de la proporción de TPP a quitosano hay una disminución en el potencial zeta desde 53.7 (relación 50:1 quitosano:TPP) a 36.7 mV (relación 2:1 quitosano:TPP).

Tabla 16. Formación de nanopartículas de quitosano CS1 (0.1% m/V) con distintas proporciones de TPP (0.1% m/V) en CH_3COOH 1% (m/V).

Quitosano/TPP	Tamaño* (nm)	Potencial zeta (mV)
50:1	797	53.7
20:1	750	52.3
10:1	675	51.2
5:1	560	47.6
3:1	482	42.5

2:1**187****36.7**

*Valores obtenidos con un factor de atenuación del equipo de 7.

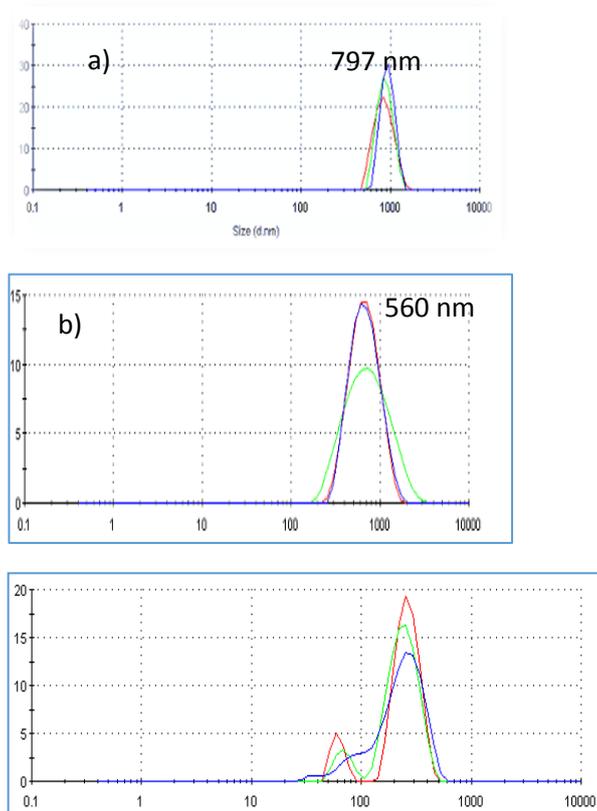


Figura 59 Tamaños de partícula obtenidos con la gelación iónica quitosano-TPP y expresada en % de intensidad vs tamaño de partícula, a) 50:1, b) 5:1 c) 2:1.

El quitosano de partida **CS1** a concentración de 2.5% m/V sin entrecruzar con TPP se analizó en el aparato Zetasizer observándose la formación de micropartículas de 1.6 μm y una segunda señal a 294 nm con poca intensidad, sin obtener una lectura estable de potencial zeta por la naturaleza dinámica de los agregados.

Para mejorar la homogeneidad de los tamaños de nanopartículas se disolvió el quitosano en un tampón que reduce la formación de agregados (0.1 M NH₄OAc /0.2 M CH₃COOH),²⁵² pH=4.5, con una concentración de quitosano de 0.1 % m/V y se preparó una solución de TPP a concentración de 0.1 % (m/V) en el mismo tampón. En la Tabla 17 se indican los valores de tamaños de partículas: 323 nm, las obtenidas a una relación de quitosano:TPP de 20:1 y 187 nm las obtenidas a una relación de quitosano:TPP 5:1. Para este tamaño de nanopartícula no apareció una segunda señal de tamaño de nanopartícula a 37 nm, como se había observado preparando las nanopartículas en CH₃COOH. En cuanto al potencial zeta, éste bajó de 30.1 mV a una relación de quitosano:TPP 20:1, hasta 21.0 mV cuando la relación de quitosano:TPP es de 5:1. Los resultados de potencial zeta y estabilidad son similares a los encontrados en nanopartículas de quitosano preparadas en sales monovalentes como NaCl.²⁵³

Tabla 17. Formación de nanopartículas de quitosano CS1 (0.1 % m/V) con distintas proporciones de TPP (0.1% m/V) en tampón de 0.1 M NH₄OAc/0.2 M CH₃COOH.

Quitosano/TPP	Tamaño* (nm)	Potencial zeta (mV)
20:1	323	30.1
10:1	253	24.3
5:1	187	21.0

* Valores obtenidos con un factor de atenuación del equipo de 6.

²⁵² Nguyen, S.; Winnik, F. M.; Buschmann, M. D. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *75*, 528–533.

²⁵³ Jonassen, H.; Kjøniksen, A. L.; Hiorth, M. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3747–3756.

Con la utilización del tampón de acetato de amonio/ácido acético se obtuvo mayor cantidad de nanopartículas (factor de atenuación = 6) y mayor estabilidad con el tiempo en el tamaño y potencial zeta de las nanopartículas preparadas comparada a las nanopartículas preparadas en CH₃COOH al 1% (m/V). Además, se obtuvo menor tamaño de nanopartículas utilizando el tampón a la misma proporción quitosano:TPP, aunque menor potencial zeta. Interesantemente el quitosano de partida **CS1** a concentración de 0.1 % m/V en tampón de NH₄OAc/CH₃COOH sin entrecruzar con TPP se analizó en el Zetasizer observándose la formación de partículas de tamaño 500 nm en lugar de 1.6 µm en ácido acético y se obtuvo una lectura estable del potencial zeta de 35 mV.

Debido a la alta fluorescencia del 2-[(7-hidroxicumarin-4-il)acetamido]quitosano (**4**) (descrito en el Capítulo 1 de esta memoria), incluso cuando el grado de incorporación (DS) del cromóforo en el esqueleto polimérico es del 1%, nos propusimos preparar nanopartículas de distintos tamaños a partir de este derivado y TPP. Se estudió primeramente el efecto del TPP sobre la emisión de fluorescencia del ácido 7-hidroxicumarin-il-4-acético en tampón 0.1 M NH₄OAc /0.2 M CH₃COOH. Este compuesto fue preparado a una concentración de 1 mg/mL y diluido 1 a 50 en el mismo tampón. Se registró un incremento de la fluorescencia con la adición de 100 µl de TPP con respecto a la solución sin TPP y sin un incremento significativo de la emisión de fluorescencia con la adición de más cantidad de TPP. La adición de TPP no tuvo un efecto en el espectro UV de la cumarina ácido 7-hidroxicumarin-il-4-acético, manteniéndose el mismo valor de λ_{\max} .

En la Tabla 18 se muestran los tamaños y potenciales zeta de nanopartículas preparadas a partir del derivado cumarínico de quitosano **4** a una concentración de 1 mg/mL en tampón de acetato de amonio/ácido acético y TPP a 0.1 % m/V en el mismo tampón. Los distintos tamaños de nanopartículas fueron 323, 223, 192 y 168 nm con potenciales zeta de 30.2, 26.1, 20.0 y 17.0 mV, respectivamente.

Tabla 18. Formación de nanopartículas del derivado cumarínico de quitosano **4** (0.1% m/V) con distintas proporciones de TPP (0.1% m/V) en tampón 0.1 M NH₄OAc /0.2 M CH₃COOH.

Derivado/TPP	Tamaño (nm)	Potencial zeta (mV)
20:1	323	30.2
10:1	223	26.1
6:1	192	20.0
5:1	168	17.0

El espectro de fluorescencia de las nanopartículas obtenidas a partir del derivado **4** (Figura 60) mostró que a medida que disminuía el tamaño de nanopartícula, igualmente disminuía la fluorescencia. La intensidad de fluorescencia se normalizó con respecto a la del derivado de quitosano **4** preparado en 0.1 M NH₄OAc /0.2 M CH₃COOH (a ella se asignó el valor 100%); así, para la nanopartícula de menor tamaño (168 nm) se observa una caída de la fluorescencia hasta el 28 %.

Las nanopartículas del derivado **4** presentaban el mismo λ_{\max} de absorción en UV que el derivado de quitosano **4** por lo que la disminución de la fluorescencia no se debe a la diferencia de la absorción a 325 nm. Esta reducción de la fluorescencia con la disminución del tamaño se puede deber

al mayor acercamiento de las unidades fluorescentes unas a otras y el fenómeno conocido como *quenching* causado por agregación.^{254,255}

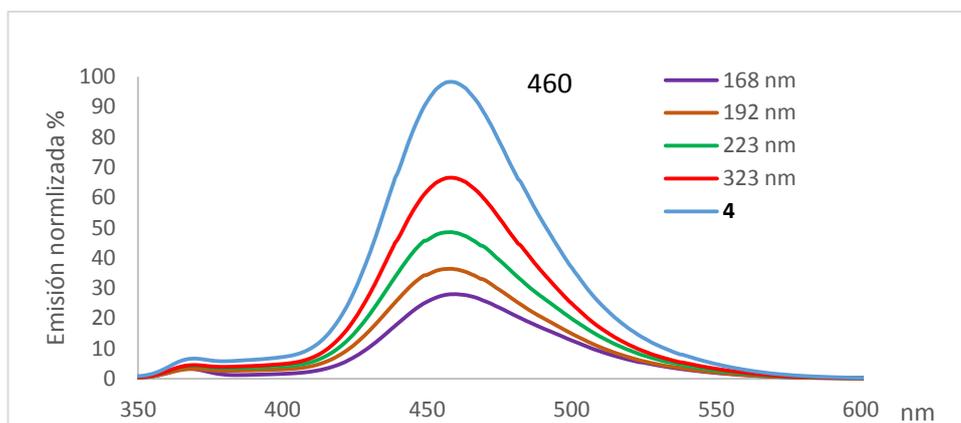


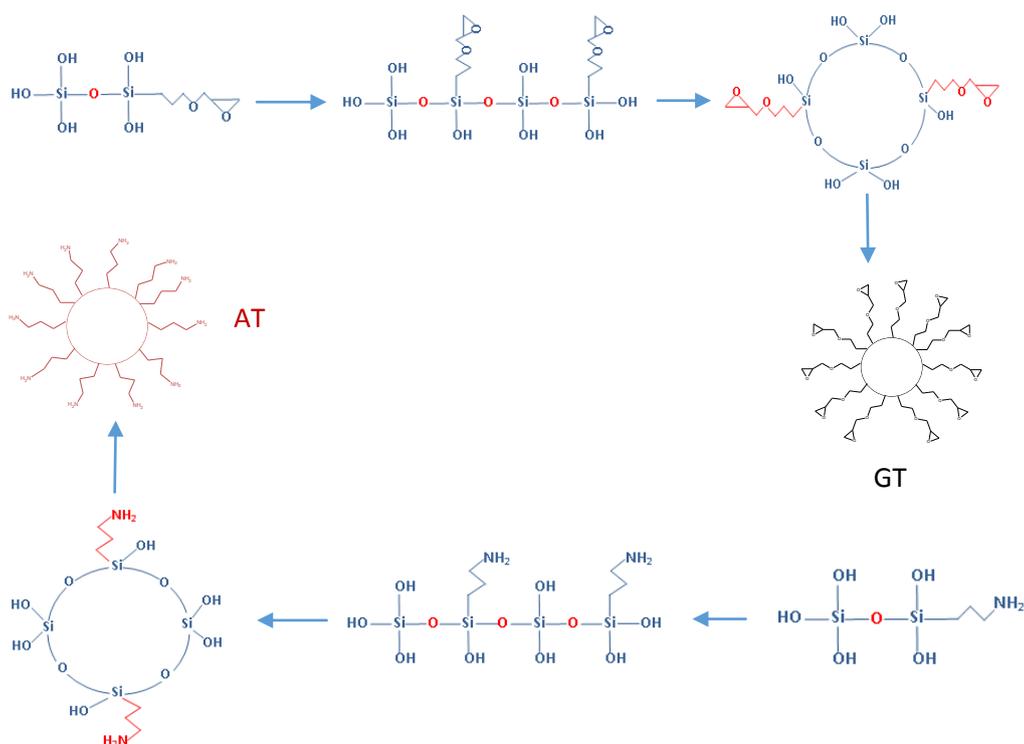
Figura 60. Espectro de fluorescencia de nanopartículas preparadas a partir del derivado cumarínico **4** y TPP en comparación con el espectro del compuesto **4** (línea azul).

²⁵⁴ Wu, Z.-S.; Jiang, J.-H.; Fu, L.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q. *Anal. Biochem.* **2006**, *353*, 22–29.

²⁵⁵ Li, K.; Liu, B. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 6570–6597.

6.3.2.2 *Formación de geles de quitosano-nanopartículas GT*

Hemos estudiado el tiempo requerido para la formación de geles basados en la reacción entre las nanopartículas **AT** y **GT** (Esquema 24) y la dependencia del mismo con el pH como una clave para optimizar el proceso de formación de geles en la reacción entre quitosano y las nanopartículas **GT** (**CS-GT**) que nos habíamos propuesto como objetivo y del que no existen antecedentes en la literatura. Las nanopartículas **AT** se prepararon a partir de 3-aminopropil trimetoxisilano y el alcóxido de sílica tetrametil ortosilicato (TMOS), mientras que las nanopartículas **GT** se prepararon a partir del epóxido 3-glicidiloxipropil trimetoxisilano y TMOS. El proceso de formación de gel se evaluó a través del aumento de la viscosidad de la solución en función del tiempo.



Esquema 24. Formación de nanopartículas AT y GT.

Inicialmente, el ensayo de formación de geles de quitosano con nanopartículas **GT** se realizó preparando una solución de quitosano **CS3** ($M_w = 86352 \text{ g mol}^{-1}$, DD = 86%) (1% m/V) en CH_3COOH 0.175 M, pH 2.9 tomando una alícuota de 8 mL de esta solución y adicionándole 750 μL de nanopartículas **GT**. Sin embargo, la viscosidad del quitosano de partida se mantuvo constante (42 cpoise) y no se formó gel, incluso después de transcurridas 168 horas de reacción. Debido a que la reacción de formación del gel implica el entrecruzamiento significativo que lleva a la formación de una red como se observa en la reacción entre las nanopartículas **AT-GT** (Figura 61) se realizaron una serie de ensayos (Tabla 19) para establecer si la reacción entre quitosano y **GT** había ocurrido y para confirmar la posibilidad de que en caso de que no se formara gel era porque el quitosano se plegaba sobre una o varias nanopartículas **GT** disminuyendo la formación de entrecruzamientos y por ende la formación de gel.

En la Tabla 19 se muestra cómo en el Ensayo 3 tiene lugar la formación de un gel tras 20 minutos de reacción, lo que implica la presencia de grupos epóxido libres que puedan reaccionar con las nanopartículas **AT**. Por otro lado, si en la misma reacción en lugar de agregar **AT** se adiciona glutaraldehído (Ensayo 5), también se forma un gel en 5 minutos y por tanto confirma la presencia sustancial de grupos aminos libres. Ambos ensayos confirmaron primeramente que las moléculas de quitosano no se estaban plegando sobre o encapsulando las nanopartículas **GT**, o reaccionando, pues en ese caso no habría disponibilidad de moléculas **GT** para reaccionar con **AT**. En adición, la formación rápida de un gel con glutaraldehído confirmaba la presencia de grupos aminos libres en gran cantidad.

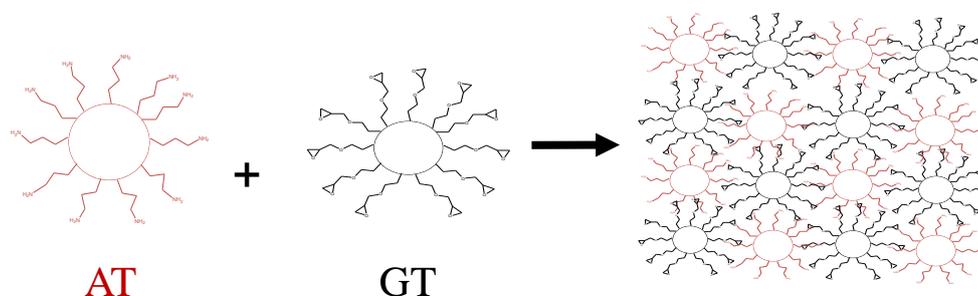


Figura 61 Entrecruzamiento entre nanopartículas AT y GT con formación de gel.

De especial relevancia fue el hecho de que la adición de **AT** sobre una mezcla **GT**-quitosano formaba un gel (Figura 62) que englobaba quitosano precipitado (que tiene lugar en medio básico). Esto fue el punto de partida que nos llevó a investigar si la reacción era dependiente del pH. Por esta razón se procedió a realizar una serie de ensayos para determinar las condiciones óptimas de pH a que gelificaba la reacción entre **GT** y **AT** (**Tabla 20**), para aplicar este principio a la reacción entre quitosano y **GT**.

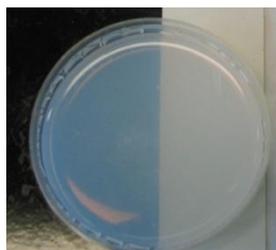


Figura 62. Precipitación del quitosano por adición de nanopartículas **AT** a sobre la mezcla quitosano-**GT**.

Tabla 19. Ensayos cualitativos de formación de gel entre **GT**, **AT**, quitosano y glutaraldehído.

Ensayo	React 1	React 2	React 3	Formación de gel t (min)	Conclusión
1	GT	AT		16	
2	GT	CS3		No hay formación después de 240 h.	
3	GT		AT	20	Grupos epoxi libres
4	CS3	Glut		5	
5	GT	CS3	Glut	5	Grupos amino libres

Se observó que la formación de geles entre las nanopartículas **GT** y **AT** ocurría más rápido a un pH neutro o en condiciones básicas que en condiciones ácidas y que la formación del gel era más rápida a un pH de 7.5 (16.33 minutos) y mucho más lenta a un pH de 2.7 (1800 minutos) (Tabla 20).

Tabla 20. Tiempo de formación de geles entre nanopartículas **AT** y **GT** en función de NaOH o CH₃COOH glacial agregado.

Ensayo	1	2	3	4	5	6	7
GT (mL)	770	770	770	770	770	770	770
CH ₃ COOH glacial	10	40	80	-	-	-	-
NaOH 0.5M	-	-	-	-	10	40	80
H ₂ O	90	60	20	100	90	60	20
AT	385	385	385	385	385	385	385
Tiempo de gelificación (min)	40	1240	1800	16.33	19.58	19.58	26

En la **Tabla 21** se observan los resultados del ensayo de formación de geles de soluciones de quitosano de 1% y 2 % (m/v) a t.a y a 60 °C ajustando el pH final de la reacción en un rango de pH de 5.9 y 6.1. La gelificación ocurrió más rápidamente a una mayor concentración de la

solución de quitosano (2 % m/v) y a una temperatura de 60 °C. Combinando la información de la **Tabla 20** y la **Tabla 21** podemos establecer que, en efecto, en este proceso sol-gel, la reacción de apertura de epóxido y de entrecruzamiento entre las nanopartículas **GT** y el quitosano es dependiente del pH y de la temperatura. Según puede deducirse de los datos mostrados en la Tabla 21, las condiciones óptimas de formación del gel (menor tiempo de gelificación, 12 h) corresponden a un proceso de reacción realizado a pH = 5.9 y una temperatura de 60 °C.

Tabla 21. Tiempo de formación de geles mediante la reacción entre el quitosano y nanopartículas GT.

Muestra	Volumen sol. Quitosano (mL)	Solución de nanopartículas GT (mL)	pH	temp.	Tiempo de gelificación (h)
CS1 (1%)*	8	0.75	6.1	t.a.	96
CS3 (1%)	8	0.75	6.1	t.a.	96
CS3 (1%)	8	0.75	6.1	60 ⁰ C	72
CS1 (2%)	8	0.75	5.9	t.a.	18
CS3 (2%)	8	0.75	5.9	t.a.	18
CS3 (2%)	8	0.75	5.9	60 ⁰ C	12

* Concentración de quitosano expresada en (m/V)

CONCLUSIONES/*CONCLUSIONS*

Conclusiones

PRIMERA

Los quitosanos de partida empleados en el curso de la investigación, tanto los preparados (**CS1** y **CS2**) por nuestro equipo en el Dpto. de Ingeniería Química de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla a partir de la quitina extraída de los residuos de *Procambarus clarkii* suministrados por las empresas colaboradoras, como los comerciales (**CS3-CS6**) se han caracterizado determinando sus Mw, Mn y PD mediante HPLC/SEC.

SEGUNDA

Se han empleado dos aproximaciones para modular la incorporación de nuevas unidades fluorescentes/biológicamente activas al esqueleto polimérico: (a) formación de enlaces de tipo amida y (b) apertura nucleófila de manera quimio- y regioselectiva de una función de tipo epóxido. El grado de sustitución de estas reacciones se encuentra en el rango de 6.1 a 42.0 % determinado mediante ^1H RMN. El análisis de los derivados anfífilicos sintetizados mediante HPLC/SEC muestra que las condiciones de reacción empleadas no provocan degradación de la cadena polimérica independientemente del tipo de quitosano empleado. Adicionalmente, se ha estudiado la capacidad de formación de micelas, estimándose una CMC próxima a 0.8 mg/mL.

TERCERA

Se ha optimizado un procedimiento sencillo para la síntesis heterogénea de iminas fluorescentes derivadas de quitosano en condiciones suaves preservando la integridad de la cadena polimérica. Extrapolando estas condiciones a la reacción simultánea con varios aldehídos de diferente naturaleza permite obtener bases de Schiff mixtas cuya formación está controlada electrónicamente y estéricamente. El empleo de agentes reductores como NaBH_4 o NaBH_3CN sobre las iminas obtenidas posibilita el acceso a nuevas aminas secundarias derivadas del biopolímero. Los grados de sustitución para estos compuestos se han determinado por dos técnicas espectroscópicas en función de criterios de estabilidad/solubilidad: (a) ^1H RMN en solución y (b) ^{13}C CP MAS RMN en estado sólido. La comparativa sin precedentes de los resultados obtenidos por ambas técnicas ha permitido correlacionar empíricamente los DS ($\text{DS}_{\text{solución}} = 1.64 \times \text{DS}_{\text{sólido}} + 1.07$) de forma efectiva. Adicionalmente, un sistema que puede ser considerado una presentación multivalente de un polímero sobre el esqueleto de otro polímero (estructura **23**), se ha preparado mediante aminación reductiva del quitosano **CS4** con un polisacárido polimaltosídico.

CUARTA

Algunos de los nuevos imino y amino derivados de quitosano emiten fluorescencia con alta intensidad y estabilidad. Su uso como sensores de polaridad se exploró con la base de Schiff obtenida por reacción del quitosano con el bifenil-4-carboxaldehído, encontrándose que la adición de pequeñas cantidades de disolvente no polar como el diclorometano, provocaba drásticos cambios en la longitud de onda e intensidad de la

Conclusiones/Conclusions

emisión. La fuerte fluorescencia de los nuevos derivados de quitosano en comparación con los aldehídos iniciales y los resultados preliminares obtenidos, hace de este tipo de compuestos, y en particular de los imino derivados, una prometedora clase de sensores fluorescentes quirales de aplicación en sistemas biológicos, con longitudes de onda de emisión de modulables la naturaleza de los aldehídos de partida utilizados.

QUINTA

Derivados de quitosano (**CS4**) conteniendo un puente de urea de estructuras **29-31** (DS comprendidos entre 9.6 y 22.5% por ^1H RMN) se han preparado por reacción del biopolímero en suspensión metanólica a pH 6.2 y temperatura ambiente con aril isocianatos. Adicionalmente, se han preparado derivados de quitosano entrecruzados de estructuras **32** y **33** (DS 5.8 y 29.2%, respectivamente, por ^1H RMN), a partir de quitosano y alquil y aril diisocianatos. Los procesos transcurren de manera completamente quimioselectiva en el grupo amino del quitosano, según cabe esperar de las condiciones de reacción y se deduce de la ausencia de banda de carbamato en torno a 1700 cm^{-1} en FTIR, de la información proporcionada por ^1H RMN, 2D ^1H - ^1H COSY y de la insolubilidad de los productos en disolventes orgánicos, que confirman la ausencia de *O*-sustitución.

SEXTA

La cuaternización de los quitosanos de bajo peso molecular con cloruro de glicidiltrimetilamonio (GTMAC) en condiciones ácidas y neutras, amplía el rango de solubilidad de los mismos hasta pH 11.0 y 12.0, respectivamente. El proceso de apertura del anillo oxiránico del GTMAC

ocurre regioselectivamente sobre el carbono menos sustituido del mismo (estructura **34**), según se deduce del análisis de los espectros ^1H RMN en distintos disolventes deuterados y de los espectros 2D ^1H - ^1H COSY de los productos.

SÉPTIMA

La cuaternización de los derivados *N*-sustituídos de quitosano se logra satisfactoriamente (DQ comprendidos entre 33.8 y 63.5 %) aplicando dos estrategias. La primera, que consiste en hacer reaccionar el derivado *N*-sustituído con GTMAC, ésta se ha aplicado a una estructura tipo urea aplicó para obtener la urea cuaternizada de estructura **35** a partir del *N*-(3,5-dimetilfenilcarbamoil)quitosano (**30**). En la segunda, el quitosano cuaternizado se somete al proceso de *N*-sustitución deseado. Esta estrategia se ha ensayado en la aminación reductiva del quitosano con el 4-hidroxibenzaldehído obteniéndose la imina cuaternizada **36** y la amina secundaria cuaternizada **37**. Esta estrategia se ha ensayado en la aminiación reductiva del quitosano con el 4-hidroxibenzaldehído.

OCTAVA

Se ha desarrollado un procedimiento para la preparación de *films* a partir de quitosanos de peso molecular bajo y medio por *casting* en microondas con ciclos de calentamiento y enfriamiento. La formación del *film* transcurre mucho más rápidamente (40 min) que en otros métodos de secado descritos (48-72 horas). Además, se ha puesto a punto la funcionalización directa de los *films* previamente obtenidos por tratamiento de éstos con el reactivo deseado, para obtener *films* basados en derivados de quitosano *N*-sustituídos, como se describe para la modificación por tratamiento con 4-

Conclusiones/Conclusions

nitrobenzaldehído, 4-hidroxibenzaldehído o bifenil-4-carboxaldehído. La morfología de los films obtenidos se ha visualizado mediante microscopio electrónico de barrido y microscopio confocal.

NOVENA

Se han investigado las propiedades mecánicas de los films de quitosano y de sus derivados preparados por irradiación con microondas y se puede concluir que algunos de ellos son más resistentes (Módulo de Young = 3360-5129 MPa y TS = 45.5-61.7 MPa) y poseen mayor rigidez (%EB = 2.3-2.8) que los hasta ahora descritos en la literatura a partir de quitosano.

DÉCIMA

Por su actividad antimicrobiana tenemos dos compuestos interesantes en términos de aplicabilidad **el quitosano CS1** en disolución, que presenta la máxima capacidad de inhibición frente a ambas bacterias y la amina secundaria derivada de quitosano de estructura **16** que, tanto en estado sólido como si es un film (neutralizado o sin neutralizar) presenta actividad antibacteriana sobre los tres tipos de bacterias analizados, y en disolución presenta valores muy elevados del % de inhibición en todos los casos.

UNDÉCIMA

Un estudio comparativo de la preparación de nanopartículas de quitosano por el procedimiento de gelación iónica con tripolifosfato de sodio en 1 % CH₃COOH y en tampón 0.1 M NH₄OAc /0.2 M CH₃COOH demuestra que se obtienen mayor cantidad de nanopartículas, con tamaños más homogéneos, y menor tamaño para la misma relación quitosano:TPP,

aunque con menor potencial zeta, al utilizar el medio tamponado. Se han preparado también nanopartículas fluorescentes entrecruzando con TPP el derivado fluorescente de quitosano-cumarina de estructura **4** en tampón 0.1 M NH₄OAc /0.2 M CH₃COOH. Hemos constatado que las nanopartículas de menor tamaño en este caso fueron de 168 nm y hemos puesto de manifiesto que existe una correlación el tamaño de partícula y la emisión de fluorescencia, obteniéndose menor fluorescencia a menor tamaño.

DUODÉCIMA

El estudio preliminar realizado sobre la formación de geles híbridos basados en la reacción entre nanopartículas de siloxano y quitosanos de bajo peso molecular, que ha permitido optimizar las condiciones para la formación de geles entre los quitosanos mencionados y nanopartículas **GT**, ha puesto de manifiesto que el proceso de gelificación en estos casos es claramente dependiente del pH y la temperatura.

Conclusions

FIRST

The M_w , M_n , and PD of all samples of starting chitosan used during this research were determined by HPLC/SEC. These samples were either prepared (**CS1** and **CS2**) by our team in the Department of Chemical Engineering of the Faculty of Chemistry of the University of Seville from the chitin extracted from the residues of *Procambarus clarkii* provided by the collaborating companies or obtained commercially (**CS3-CS6**).

SECOND

To approaches have been employed for modulating the incorporation of the new fluorescent/biologically active units to the polymeric backbone: (a) formation of amide type of bond and (b) nucleophilic opening in a chemio-regioselective manner of an epoxide type function. The substitution degree of these reactions is within the range of 6.1% and 42% determined by ^1H RMN. The analysis of the synthesized amphiphilic derivatives by HPLC/SEC shows that there is no degradation of the polymeric chain in the reaction conditions independently of the type of chitosan used. Additionally, the capacity of micelle formation has been studied, being the CMC around 0.8 mg/ml.

THIRD

A straightforward procedure has been optimized for the heterogeneous synthesis of fluorescent chitosan imines derivatives in mild conditions preserving the integrity of the polymeric chain. Extrapolating these conditions to the simultaneous reaction of several different aldehydes of different nature allows obtaining mixed Schiff bases whose formation is electronically and sterically controlled. Using reducing agents such as NaBH_4 or NaBH_3CN over the obtained imines allows the access of new secondary amines derived from the biopolymer. The substitution degree for these compounds have been determined by two distinct spectroscopic techniques in function of stability/solubility (a) ^1H RMN in solution and (b) ^{13}C CP MAS RMN in solid state. The unprecedented comparison of the obtained results by both technique has allowed us to correlate empirically the DS ($\text{DS}_{\text{solución}} = 1.64 \times \text{DS}_{\text{sólido}} + 1.07$ in an effective way. Additionally, a system that can be considered a multivalent presentation of a polymer over the the backbone of the polymer (structure 23), has been prepared by reductive amination of chitosan CS4 with a polymaltosidic polysaccharide.

FOURTH

Several of the new chitosan imine and amino derivatives emit fluorescence with high intensity and stability. Their use as sensor as polarity was explored with the Schiff base obtained by the reaction of chitosan with biphenyl-4-carboxaldehyde, finding that the addition of traces of nonpolar solvent such as dichloromethane, caused drastic changes in the wavelength and the emission intensity. The strong fluorescence of the new chitosan derivative, a promising class of a chiral fluorescent sensor with applications

Conclusiones/Conclusions

in biological systems, with tunable emission wavelength depending on the nature of the starting aldehyde used.

FIFTH

Additionally, crosslinked chitosan structure **32** y **33** (DS 5.8 y 29.2%, respectively, by ^1H RMN starting from chitosan y alkyl and aryl diisocyanate. The processes undergo through a completely chemoselective in the amine group of chitosan, according to what is expected from reaction conditions, and it is deduced from the absence of the carbamate band which appears around 1700 cm^{-1} in FTIR, from the information provided by ^1H RMN, 2D ^1H - ^1H COSY and the insolubility of the products in organic solvents, which confirm the absence of the *O*-substitution.

SIXTH

The quaternization of low molecular weight chitosan with glycidyltrimethylammonium chloride (GTMAC) in acid and neutral condition, it widens the range of solubility of these until pH 11.0 and 12.0; respectively, respectively. The process of ring opening of the oxiranic ring of GTMAC occurs regioselectively over the carbon less substituted of the same (structure 34), according to what is deduced from the analysis of the ^1H RMN spectra in the different deuterated and the 2D ^1H - ^1H and COSY of these products.

SEVENTH

The quaternization of chitosan *N*-substituted derivatives is achieved successfully (DQ within 33.8 y 63.5 %) applying two strategies. The first, which consists in reacting the *N*-substituted with GTMAC, it has been applied

as a structure **35** form *N*-(3,5 dimethylphenylcarbamoyl)chitosan (**30**). In the second, the quaternized chitosan is subjected to the desired *N*-substitution process. This strategy has been essayed in the reductive amination of chitosan with 4-hydroxybenzaldehyde obtaining the quaternized imine **36** and the secondary quaternary **37**. This strategy has been essayed in the reductive amination of chitosan with 4-hydroxybenzaldehyde.

EIGHT

A procedure for the preparation of films starting with low molecular and medium molecular weight chitosan has been developed (**CS1** and **CS6**, respectively) by using microwave casting with cooling and heating cycles. Film formation is much faster (40 min) in this case compared to other described casting methods (48-72 hours). In addition, direct functionalization previously obtained films by treatment of these with the desired reagents, to obtain films based on *N*-substituted chitosan derivatives, as it is described for the modification with 4-nitrobenzaldehyde, 4-hydroxybenzaldehyde or biphenyl-4-carboxaldehyde. The morphology of the obtained films has been visualized by SEM and by confocal microscopy.

NINTH

The mechanical properties of chitosan films and its derivatives prepared by microwave irradiation have been studied and it can be concluded that some of them are more resistant [Young's Modulus = 3360-5129 MPa and Tensile Strength (TS) = 45.5-61.7 MPa] and are more rigid (%EB = 2.3-2.8) than the ones described so far in literature for chitosan.

TENTH

Conclusiones/Conclusions

In terms of applicability, we have two interesting antimicrobial compounds: chitosan CS1 in dissolution, which present the maximum capacity of inhibition against both types of bacterias, and the chitoan secondary amine derivative of structure 16, which in both solid state and as a film (neutralized o without neutralizing) presents antibacterial activity over the three types analysed bacteria, and in dissolution present very high % of inhibition values in all cases.

ELEVENTH

A comparative study of chitosan nanoparticles preparation by the ionic gelation procedure with sodium tripolyphosphate in 1% CH₃COOH and in 0.1 M NH₄OAc /0.2 M CH₃COOH buffer demonstrates that in the buffer higher amount of nanoparticles were formed, with more homogeneous and smaller sizes, for the same chitosan:TPP relation, although with less zeta potencial. Fluorescent nanoparticles have been prepared by crosslinking the fluorescent coumarin-chitosan derivative of structure **4** with TPP in 0.1 M NH₄OAc /0.2 M CH₃COOH buffer. The smallest nanoparticles were 168 nm and we found a correlation between the size of the particle and the fluorescence emission, obtaining that the the smaller the size of the nanoparticle the less is its fluorescence emission

TWELVETH

A preliminary study of hybrid gels formation based on the reaction of siloxane nanoparticles and low molecular weight chitosan (**CS1** y **CS3**), in which the gel formation conditions between the before mentioned chitosans and **GT** nanoparticles have been optimized, has shown that the gelification process is clearly a pH and temperature dependent process.

PARTE EXPERIMENTAL

8.1 MÉTODOS GENERALES.

Los *puntos de fusión* se midieron en un aparato analógico Electrothermal o en uno digital Electrothermal 9200 y no están corregidos.

La *cromatografía de capa fina (c.c.f.)* con fines cualitativos se realizó utilizando placas de gel de sílice sobre aluminio (*Merck 60 F254*) de 0.25 mm de espesor. Como eluyentes se han empleado los indicados para cada caso. La detección de los compuestos en las placas se ha realizado por exposición de éstas a la luz UV ($\lambda = 254$ y 360 nm) y mediante revelado por inmersión en disoluciones de H₂SO₄ en EtOH al 10%.

Para la *cromatografía en columna* con fines preparativos, se ha empleado como fase estacionaria gel de sílice 60A, tamaño de partícula 70–200 μm , eluyendo por gravedad o sometiendo a una ligera presión. Los eluyentes empleados se indican en cada caso.

Las *medidas de pH* se realizaron con un pH-metro de la marca Crison modelo *Crison pH Basic20*. La calibración del aparato se ha llevado a cabo con tampones comerciales de pH= 4.01, 7.02 y 9.21.

La *rotación óptica* se ha medido en un polarímetro *Jasco P-2000*, empleando la línea de emisión del sodio ($\lambda=589$ nm) en celdas de 1 cm ó 1 dm de camino óptico. El disolvente y concentración empleados se indican en cada caso.

Los espectros de *FT-IR* se realizaron depositando de 2 a 5 mg del producto en el cristal de ATR de un aparato *Jasco FT/IR-4100* con una resolución de

4 cm^{-1} y tiempo de adquisición de 60 a 120 s. En algunos de los espectros obtenidos se realizó el suavizado (smoothing) de la curva utilizando el algoritmo de Savitzki Golay²⁵⁶ con valores entre 15 y 25 en el parámetro de suavizado utilizando software Jasco Spectra Analysis Manager Version 2.06.

Los *espectros de RMN* en disolución se adquirieron en un espectrómetro Bruker Avance 300 (300.1 MHz para ^1H y 75.5 MHz para ^{13}C), en un espectrómetro Bruker Avance III (500.1 MHz para ^1H y 125.8 MHz para ^{13}C) o en Bruker Avance (700 MHz para ^1H y 150.9 MHz para ^{13}C), registrados de 2 a 24 horas después de la preparación de las muestras, utilizando 128 scans a 300 K y un tiempo de relajación de 5-10 s con un pulso de 45° . Se han empleado como disolventes CDCl_3 , CD_3OD , $\text{DMSO-}d_6$, D_2O , 0.16% DCl o 1-50% CD_3COOD , dependiendo de la solubilidad del compuesto analizado. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y los valores de las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Los espectros se han calibrado usando las señales del disolvente como referencias internas o tomando como referencia el tetrametilsilano (δ , 0 ppm), o el DDS [4,4-Dimetil-4-silapentano-1-ácido sulfónico [δ , ppm, 0.0 (s), 0.60 (t), 1.77 (q), 2.91 (t)]. En algunos casos se ha empleado el espectrómetro Avance AV 500 con criosonda TCI 500 H-C/N-D.

La asignación de las señales en ^1H RMN y ^{13}C RMN se ha realizado en los casos necesarios mediante el uso de experimentos 2D como ^1H - ^1H COSY (8 scan, 300 K) y ^1H - ^{13}C HSQC.

²⁵⁶Savitzky, A.; Golay, M. *Anal. Chem.* **1964**, 36, 1627.

Las abreviaturas empleadas para indicar la multiplicidad son: s (singulete), d (doblete), t (triplete), c (cuartete), dd (doblete de doblete) y m (multiplete).

Los espectros de ^{13}C CPMAS RMN se adquirieron con 2000 scans a 300 K en un espectrómetro de Bruker Avance III (150.9 MHz para ^{13}C) usando los parámetros sugeridos por Guinesi²⁵⁷ y Knicker⁹² respectivamente con modificaciones. Para estos experimentos, el tiempo de contacto y la relajación fueron de 2 ms and 4 s, respectivamente. Estos espectros de RMN fueron registrados con frecuencias de barrido de 10 y 14 kHz, y calibrados respecto a una referencia externa de TMS.²⁵⁸ Las determinaciones de las líneas bases para la integración de señales de los espectros de RMN fueron llevadas a cabo comparando áreas calculadas por TopSpin 3.0 y el software Jasco Spectra Analysis Manager Version 2.06.

Los espectros de masas se han realizado en espectrómetros *QTRAP*(*Applied Biosystems*) empleando la ionización por electrospray a 5.5 kV, y una bomba de infusión regulable en 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ (microinfusión) como sistema de introducción.

**Estudio cinético en imino derivados de quitosano (Capítulo 2 de la presente Memoria)*

La cinética de las reacciones de quitosano con cuatro aldehídos diferentes descrita en el Capítulo 2 se estudió usando un espectrofotómetro Jasco-V-630. 4-*N,N*-difenilaminobenzaldehído (9.0 mg), 4-nitrobenzaldehído (5.0 mg), 4-*N,N*-dimetilamino-1-naftaldehído (6.6 mg) y 1-pirencarboxaldehído (7.6 mg) fueron disueltos en MeOH (7.5 mL) y CH_3COOH (51 μL). El quitosano de bajo peso molecular CS5 (150 mg) se agregó a cada solución

²⁵⁷ Guinesi, L. S.; Cavalheiro, E. T. G. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *65*, 557-561.

²⁵⁸ Morcombe, C. R.; Zilm, K. W. *J Magnetic Resonance* **2003**, *162*, 479-486.

para formar una suspensión. Cada 20 minutos, se paraba la agitación y se tomaba una alícuota del sobrenadante para medir la caída en la absorbancia del aldehído (360 nm, excepto 4-nitrobenzaldehído, 265 nm).

Determinación del peso molecular de quitosano, y derivados mediante HPLC/SEC.

La determinación del peso molecular del quitosano **CS5**, hidroxilaminas y amidas derivadas de quitosano descritas en el Capítulo 1 se realizó en un sistema HPLC Agilent 1100 Series con detector UV-VIS y una columna Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare). El quitosano **CS5** y los compuestos **4** y **7** se disolvieron en PBS a una concentración de 10 mg/mL y se inyectaron en el sistema 30 µL de muestra en cada caso. La cromatografía se llevó a cabo en modo isocrático, a un flujo constante de 0.5 mL/min utilizando PBS como fase móvil, durante 60 minutos y detección a una longitud de onda de 280 nm sin recolección de fracciones.

Muestras de quitosano **CS1**, **CS2**, **CS3**, **CS4**, **CS5**, **CS6** y de aminas secundarias derivadas de quitosano (10 mg) fueron disueltas en un tampón 0.2 M CH₃COOH/0.1 M NH₄OAc (5 mL) y 24 h más tarde fueron filtradas a través de una membrana de tamaño de poro de 0.45 µm (Millipore) y utilizadas para los estudios HPLC/SEC. Estas muestras se eluyeron con una columna Ultrahydrogel linear (7.8 mm x 300 mm) con un flujo de 0.5 mL/min durante 30 min, con el mismo tampón usado para la solubilización de las muestras. La detección de las muestras se realizó con un dispersador de luz evaporativo (*Light Scattering detector* Waters 2420 y un refractrómetro diferencial Knauer. El peso molecular se determinó comparando el tiempo de retención y la anchura de las señales de las

muestras de quitosano y derivados con aquellas de dextranos y estándares de quitosano usando el software Wolfram Mathematica 9.

Medidas de fluorescencia

Las medidas de fluorescencia para las aminas secundarias derivadas de quitosano y los correspondientes aldehídos aromáticos precursores fueron llevadas a cabo a 298.2 K en un espectrofluorímetro (Hitachi f-2500), acoplado a un PC para la lectura y el manejo del espectro, con un velocidad de scan de 1500 nm/min. Las muestras (5 mg) se disolvieron en 50 % de CH₃COOH (ac) (1 mL), y se diluyeron a continuación (300:1) con H₂O para dar la muestra final de cada compuesto en 0.17% CH₃COOH. En todos los casos, la absorbancia medida a la longitud de onda de excitación no excedió 0.1. La longitud de onda seleccionada correspondió al máximo del espectro de UV visible para cada compuesto y la luminiscencia total se registró de 255 a 370 nm. Se comprobó que los resultados fueran independientes de la longitud de excitación, dado que ésta estaba en el rango de 250 y 350 nm.

Para comparar la fotoestabilidad de los compuestos bifenil-4-carboxaldehído y 10, ambas muestras fueron medidas como una solución en 0.17% CH₃COOH (ac), en una celda de cuarzo, y el experimento se realizó en el espectrofluorímetro mencionado. Cada muestra se irradió y la fluorescencia de cada solución se detectó después de cierto intervalo de tiempo en el periodo de exposición a la luz de 30 minutos.

8.2 MATERIAS PRIMAS

Ácido 3-carboxicumarínico

4-*N,N*-difenilaminobenzaldehido

Bifenil-4-carboxaldehido

4- nitrobenzaldehido

4-hidrobenzaldehido

1-pirencarboxaldehido

Dextranos de M_w 5000, 25000, 80000, 150000 y 300000 g mol⁻¹

Fenilisocianato

3,5-Dimetilfenilisocianato

4-bifenililisocianato

4,4'-metilenbis(fenilisocianato)

Hexametil diisocianato

Tetrametoxisilano

3-Aminopropil trimetoxisilano.

3-Glicidiloxipropil trimetoxisilano.

Tripolifosfato de sodio

Quitosano CS1 ($M_n = 13544 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_w = 42400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, PDI= 3.13 DD = 87%), obtenido de Departamento de Ingeniería Química.

Quitosano CS2 ($M_n = 29261 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_w = 69871 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, PDI= 2.39 DD = 91%) Ingeniería

Quitosano CS3 ($M_n = 56475 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_w = 86352 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, PDI= 1.53, DD = 85%),

Quitosano CS4 ($M_n = 48675 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_w = 87875 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, PDI= 1.81, DD = 86%) SIGMA-ALDRICH

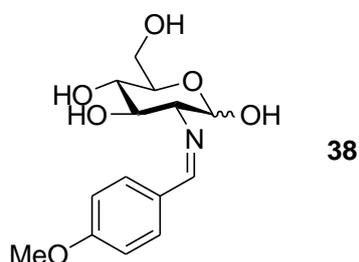
Quitosano CS5 ($M_n = 60485 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_w = 97605 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, PDI= 1.61, DD = 87%) SIGMA-ALDRICH

Quitosano CS6 ($M_n = 100158 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_w = 160253 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, PDI= 1.60 DD = 83%) SIGMA-ALDRICH

CBK10: Polímero polimaltosídico sintetizado por el grupo de investigación del Prof. C. Bliard en el Institut de Chimie Moléculaire de Reims²⁵⁹ CNRS-UMR (Francia) ($M_w = 9500 \text{ g mol}^{-1}$ aprox.)

8.2.1 Síntesis de materias primas.

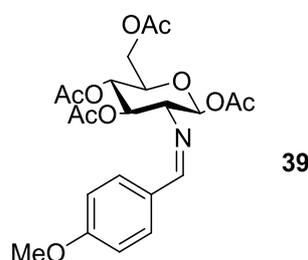
2-(4-Metoxibenciliden)imino-2-desoxi-D-glucopiranososa (**38**).²⁵⁹



²⁵⁹ Cunha, A.; Pereira, L.; De Souza, M.; Ferreira, V. *J. Chem. Ed.* **1990**, 76, 1.

Se añadió anisaldehído, recién destilado, (0.63 g, 4.63 mmol) a una mezcla de hidrocloreuro de D-glucosamina (0.997 g, 4.64 mmol) y NaOH 1M (5 mL) con agitación vigorosa. Tras 2 horas, el precipitado se filtró, se lavó con agua a 0°C y EtOH/Et₂O (1:1) y se secó a vacío, obteniéndose el producto **38** como un sólido blanco (1.10 g, 80 %).

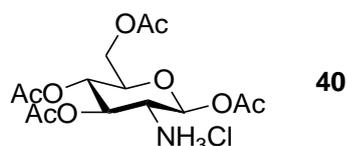
2-(4-Metoxibenciliden)imino-2-desoxi-1,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranososa (39).259



Se añadió anhídrido acético frío (3.0 mL) a una suspensión del compuesto **38** (1.0 g, 3.36 mmol) en piridina (5.4 mL) a 0° C. La mezcla resultante se agitó a esta temperatura hasta disolución completa y la reacción se dejó evolucionar a t.a durante 12 horas. La solución resultante se volcó sobre H₂O-hielo (15 mL) y se enfrió durante una hora. El sólido se filtró y se recristalizó de EtOH, obteniéndose el compuesto **39** (1.0 g, 65%). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ ppm, *J* Hz) δ 8.17 (s, 1H, C=NH), 7.66 (d, 2H, *J*_{2',3'} = 9.0, H-2'), 6.91 (d, 2H, *J*_{3',2'} = 9.0, H-3'), 5.95 (d, 1H, *J*_{1,2} = 8.4, H-1), 5.44 (t, 1H, *J*_{3,4} = *J*_{3,2} = 9.6, H-3), 5.15 (t, 1H, *J*_{4,3} = *J*_{4,5} = 9.6, H-4), 4.39 (dd, 1H, *J*_{5,4} = 10.1, *J*_{5,6a} = 4.5, *J*_{5,6b} = 1.8, H-5), 4.13 (dd, 1H, *J*_{6a,6b} = 12.5, *J*_{6a,5} = 1.8, H-6_a), 3.98 (ddd, 1H, *J*_{6a,6b} = 12.5, *J*_{6b,5} = 4.5, H-6_b), 3.84 (s, 3H, OMe), 3.46 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 9.5, *J*_{2,1} = 8.6, H-2), 2.10, 2.04, 2.02, 1.88 (s, 3H, OAc). ¹³C-

RMN (75.0 MHz, CDCl₃, δ ppm,) δ 170.4, 169.6, 169.3 y 168.5 (CO), 164.0 (C=N), 162.0, 130.0, 113.8 128.1 (Ph), 92.9 (C-1), 72.7 (C-2), 73 (C-3), 67.8 (C-4), 72.5 (C-5), 61.6 (C-6), 20.5 y 20.4 (COMe).

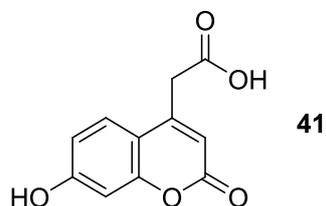
Clorhidrato de 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-amino-2-desoxi-β-D-glucopiranososa (40).



El compuesto **39** (1 g, 2.15 mmol) se disolvió en 16 mL de acetona, se calentó a reflujo y se trató con una disolución de HCl 0.5 M (0.43 mL). Se mantuvo en agitación durante una hora y la mezcla de reacción se enfrió a t.a. Se adicionó Et₂O y se dejó cristalizar en frío. El sólido obtenido, se filtró, se lavó con Et₂O y se secó a vacío obteniéndose **40** (0.68 g, 82%). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, δ ppm, *J* Hz), δ 6.04 (d, 1H, *J*_{1,2} = 8.7, H-1), 5.48 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 10.3, *J*_{3,2} = 9.0, H-3), 5.12 (a, 2H, NH₂), 5.04 (t, 1H, *J*_{4,3} = *J*_{4,5} = 9.3, H-4), 4.39 (dd, 1H, *J*_{5,4} = 10.1, *J*_{5,6b} = 4.5, *J*_{5,6a} = 1.8, H-5), 4.17-4.08 (m, 2H, H-5 y H-6_a), 4.30 (dd, 1H, *J*_{6a,6b} = 12.3, *J*_{6b,5} = 4.5, H-6_b), 3.66 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 10.2, *J*_{2,1} = 9.0, H-2), 2.29, 2.14, 2.11, 2.08 (s, 3H, OAc). ¹³C-RMN (75.0 MHz, CDCl₃, δ ppm,) δ 170.1, 169.9, 169.5 y 168.8 (CO), 90.2 (C-1), 70.4 (C-3), 52.3 (C-2), 67.9 (C-4), 71.7 (C-5), 61.4 (C-6), 20.9, 20.6, 20.5 y 20.1 (COMe).

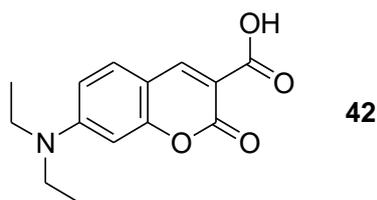
*Ácido 7-hidroxycumarin-4-il-acético (41).*²⁶⁰

²⁶⁰ Xu, X.; Hu, X.; Wang, J. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 254–259.



A una disolución de resorcinol (11.0 g, 99.9 mmol) disuelto en H₂SO₄ al 70% (100 mL), a 0°C, se adicionó, poco a poco, el ácido 1,3-acetondicarboxílico (14.59 g, 99.9 mmol). La mezcla resultante se mantuvo en agitación, a t.a, durante 4 h. Se trituró sobre hielo y el precipitado se filtró y se lavó sucesivamente con H₂O y AcOEt frío y se secó a vacío obteniéndose **41** como un sólido blanco (20.0 g, 91%). UV-visible (DMSO, MeOH): 325 nm. Fluorescencia (MeOH): 455 nm (¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz) δ 10.61 (s, 1H, COOH), 7.52 (d, 1H, *J*_{5,6} = 8.7, H-5), 6.80 (dd, 1H, *J*_{6,5} = 8.7, *J*_{6,8} = 2.1, H-6), 6.73 (d, 1H, *J*_{8,6} = 2.1, H-8), 6.22 (s, 1H, H-3), 3.82 (s, 2H, CH₂). FABMS *m/z* 221.00, calculado para [M+H]: 221.04

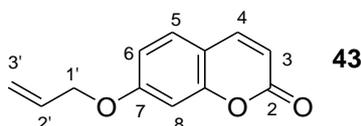
Ácido 7-dietilaminocumarin-3-il-carboxílico (**42**).²⁶¹



²⁶¹ (a) Sanap, K. K.; Samant, S. D. *Synlett* **2012**, 2189-2194. (b) Wu, J.-S. ; Liu, W.-S.; Zhuang, X.-Q.; Wang, F.; Wang, P.-F.; Tao, S.-L.; Zhang, X.-H.; Wu, S.; Lee, S.-T. *Org. Lett.* **2007**, 9, 33-36.

Se disolvieron 4-dietilaminosalicilaldehído (1.93 g, 10 mmol), malonato de dietilo (3.2 g, 20 mmol) y piperidina (1 mL) en etanol absoluto (30 mL) y la mezcla se agitó durante 6 horas bajo reflujo. Se evaporó el etanol bajo presión reducida, entonces se agregaron HCl concentrado (20 mL) y ácido acético glacial (20 mL) manteniendo la mezcla en agitación otras 6 horas. La solución fue enfriada a t.a. y vertida en 100 mL de agua-hielo. Se agregó una solución de NaOH (40%) gota a gota hasta ajustar el pH a aprox. 5.0. Se formó inmediatamente un precipitado pálido. Después de agitar durante 30 minutos, el sólido fue filtrado, lavado con H₂O, secado, y recristalizado con tolueno para dar el compuesto **42** (1.72g, 66%). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, δ ppm, *J* Hz) δ: 12.35 (s, 1H, COOH) ; 8.65 (s, 1H, H-4), 7.45 (d, 1H, *J*_{5,6} = 9.0, H-5) ; 6.72 (dd, 1H, *J* = 9.0, *J* = 2.4, H-6), 6.53 (d, 1H, *J* = 2.4, H-8), 3.49 (c, 4H, *J*_{CH₂,CH₃} = 6.9 Hz, -CH₂-), 1.2 (t, 6H, *J*_{CH₃,CH₂} = 6.9, CH₃).

7-(Aliloxi)cumarina (**43**).²⁶²



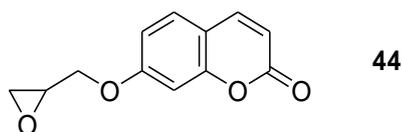
Umbeliferona (0.5 g, 3.08 mmol), carbonato de cesio (3.01 g, 9.21 mmol), y bromuro de alilo (0.82 mL, 9.21 mmol) se disolvieron en DMF y se mantuvo la solución a 60 °C durante toda la noche. Se vertió la reacción sobre un baño de agua-hielo formándose un sólido blanco. Éste se filtró y

²⁶² Carta, F.; Maresca, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2266-2273.

recristalizó en metanol/agua (1:1) resultando **43** como un sólido blanco (0.44 g, 72 %). R_f (Hexano/AcOEt 1:4) 0.51.

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): δ 7.97 (1H, d, $J_{4,3}$ 9.4 Hz, H-4), 7.62 (1H, d, $J_{5,6}$ 8.3 Hz, H-5), 6.99-6.94 (2H, m, H-6 y H-8), 6.28 (1H, d, $J_{3,4}$ 9.5 Hz, H-3), 6.11-5.98 (1H, m, H-2'), 5.42 (1H, ddd, $J_{3'a,1'}$ 1.5, $J_{3'a,2'}$ 3.3, $J_{3'a,3'b}$ 17.2 Hz, H-3'a), 5.29 (1H, ddd, $J_{3'b,1'}$ 1.4, $J_{3'b,2'}$ 3.0, $J_{3'b,3'a}$ 10.5 Hz, H-3'b), 4.67 (2H, dt, $J_{1',3'}$ 1.5, $J_{1'a,1'b} = J_{1',2'}$ 5.3 Hz, H-1'a y H-1'b).

7-(2,3-Epoxipropoxi)cumarina (**44**).²⁶³

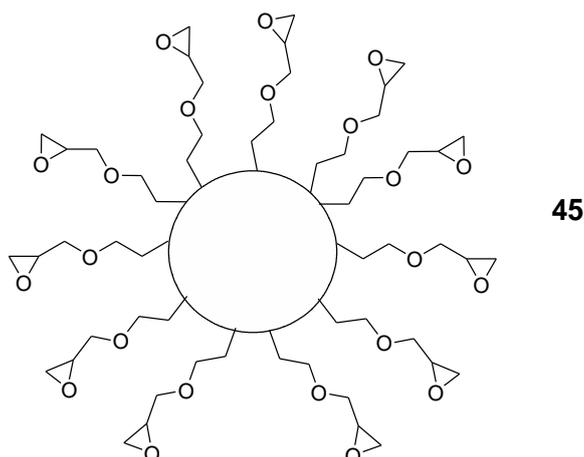


A una disolución de **43** (440 mg, 2.02 mmol) en DCM (10 ml) a 0 °C se le añade poco a poco *m*-CPBA (640 mg, 3.71 mmol) y la mezcla se deja bajo agitación 24 horas. Entonces se lava sucesivamente con Na₂SO₃ al 10% (10 ml), NaOH al 5% (10 ml) y agua (2 x 10 ml), se elimina a continuación el disolvente en el rotavapor y el residuo se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con hexano/AcOEt (4:1); se obtiene así **44** como un sólido blanco con un rendimiento del 63%.

²⁶³ Jeyachandran, M.; Ramesh, P.; Muralisankar, R. *Indian J. Heterocyclic Chem.* **2007**, *16*, 383-386

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): δ 7.64 (1H, d, $J_{4,3}$ 9.5 Hz, H-4), 7.38 (1H, d, $J_{5,6}$ 8.6 Hz, H-5), 6.88 (1H, dd, $J_{6,8}$ 2.5, $J_{6,5}$ 8.5 Hz, H-6), 6.83 (1H, d, $J_{8,6}$ 2.4 Hz, H-8), 6.27 (1H, d, $J_{3,4}$ 9.5 Hz, H-3), 4.33 (1H, dd, $J_{3'b,2'}$ 2.9, $J_{3'b,3'a}$ 11.0 Hz, H-3'b), 3.97 (1H, dd, $J_{3'a,2'}$ 5.9, $J_{3'a,3'b}$ 11.0 Hz, H-3'a), 3.41-3.36 (1H, m, H-2'), 2.94 (1H, t, $J_{1'a,1'b}$ 4.7 Hz, H-1'a), 2.79 (1H, dd, $J_{1'b,2'}$ 2.7, $J_{1'b,1'a}$ 4.7 Hz, H-1'b).

*Preparación de nanopartículas "GT" (45)*²⁶⁴

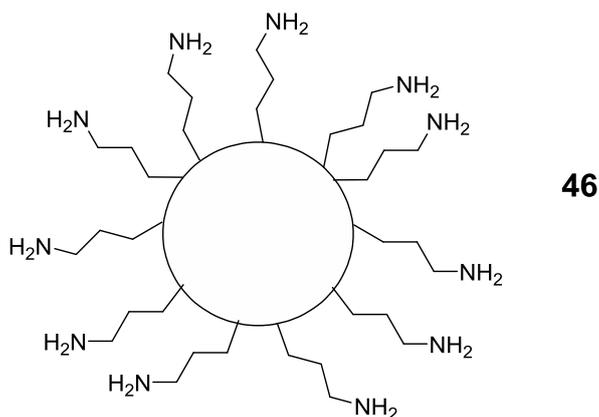


Tetrametoxisilano (TMOS) (3.17 mL) disuelto en 21 mL de CH_3COOH 0.05 M se trató bajo agitación vigorosa, gota a gota, con de 3-glicidiloxipropil trimetoxisilano (GPTMS) (15 mL durante 30 minutos y la mezcla se mantuvo en agitación durante 72 h a t.a. Transcurrido este tiempo, la solución de nanopartículas de GT (**44**) se almacenó a 4 °C hasta

²⁶⁴ Vreugdenhil, A. J.; Horton J. H.; Woods, M. E. *J Non-Cryst. Solids* **2009**, 355, 1206–1211.

efectuarse la medición del tamaño de partículas en un aparato Zetasizer Nano ZS Malvern Instruments Ltd. (UK), en la que se obtuvieron nanopartículas de tamaño de $40 \text{ nm} \pm 10$ y potencial zeta de 20 mV. El pH final de la solución de nanopartículas GT fue de 4.03.

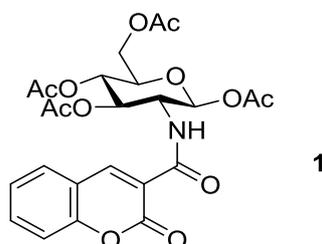
*Preparación de nanopartículas "AT" (46)*²⁶⁴



A una solución de 3 mL de TMOS en 21 mL de CH₃COOH 0.05 M se le agregaron 15 mL de 3-aminopropil trimetoxisilano (APTMS) gota a gota durante 30 minutos y se dejó que la reacción transcurriera durante 72 horas a t.a. Pasado este tiempo, la solución de nanopartículas AT (**46**) fue almacenada a 4° C hasta efectuarse la medición del tamaño de partícula en un aparato Zetasizer Nano ZS Malvern Instruments Ltd. (UK), en la que se obtuvieron nanopartículas de tamaño de $20 \text{ nm} \pm 10$ y potencial zeta de 30 mV. El pH final de la solución de nanopartículas AT fue de 10.02.

8.3 Parte Experimental. Capítulo 1. Nuevos derivados anfílicos de quitosano con funcionalidad de amida y de 1,2-hidroxilamina.

1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-(3-cumarin)carboxamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (1).

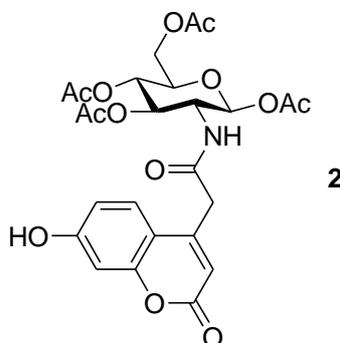


A una disolución del compuesto **40** (200 mg, 0.52 mmol) en 10 mL de CH₂Cl₂ seco, bajo atmósfera de argón, se añadió el ácido 3-carboxicumarínico (148.6 mg, 0.782 mmol) disuelto en THF (10 mL) y 211 mg (1.56 mmol) de HOBt. La mezcla se enfrió a 0°C y transcurridos 10 min se agregaron 90 μL (0.52 mmol) de DIPEA y tras 10 min más se agregaron 225 mg (1.17 mmol) de EDCI. La reacción se dejó evolucionar a t.a durante toda la noche. La mezcla se diluyó con 20 mL de CH₂Cl₂ y se lavó sucesivamente con HCl 1M (40 mL), una disolución saturada de K₂CO₃ (40 mL), H₂O (40 mL) y una disolución saturada de NaCl (40 mL). Se secó sobre Na₂SO₄, se concentró a presión reducida y se purificó mediante columna cromatográfica en gel de sílice (Hexano/AcOEt 1:3 → 3:1) obteniéndose **1** (178.7 mg, 66%) como un sólido blanco, R_F 0.61 (Hexano/AcOEt 1:3). IR (ν_{max}): 1736 (OAc), 1680 (NHAc) cm⁻¹. UV-visible (MeOH): 292 nm. Fluorescencia: (MeOH): 417 nm.

^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm, J Hz) δ 8.86 (s, 1H, H-4'), 8.76 (d, 1H, $J_{\text{N},2} = 9.6$, NH), 7.99 (dd, 1H, $J_{5,6} = 7.8$, $J_{5,7} = 1.5$, H-5'), 7.77 (dt, 1H, H-7'), 7.48 (m, 2H, H-6' y H-8'), 6.11 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.7$, H-1), 5.59 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{3,2} = 8.4$, H-3), 4.96 (t, 1H, $J_{4,3} = J_{4,5} = 9.5$, H-4), 4.36-4.20 (m, 2H, H-2, H-5), 4.09-3.99 (m, 2H, H-6_a, H-6_b), 2.03, 2.02, 1.99, 1.89 (s, 3H, OAc). ^{13}C RMN (75.0 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm,) δ 170.0, 169.6, 169.3 y 168.8 (CO), 162.2-116.6 (aromáticos), 92.4 (C-1), 72.5 (C-3), 71.9 (C-5), 68.7 (C-4), 53.0 (C-2), 61.4 (C-6), 20.5, 20.46, 20.4 y 20.3 (COMe).

CIHRMS m/z 519.1381, calculado para M^+ : 519.1377. $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{NO}_{12}$; 520.1437, calculado para $[\text{M} + \text{H}]^+$: 520.1455. $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{NO}_{12}$.

2-[(7-hidroxycumarin-4-il)]acetamido-2-desoxi-1,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosido (**2**).

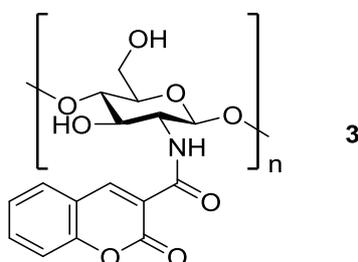


A una disolución del compuesto **40** (300 mg, 0.81 mmol) en 10 mL de CH_2Cl_2 seco, bajo atmósfera de argón, se añadió ácido 7-hidroxycumarin-4-il-acético (**41**) (267.52 mg **4** (1.22 mmol) disuelto en THF (10 mL), 332 mg (2.44 mmol) de HOBT y la mezcla se enfrió a 0°C . Transcurridos 10 min se agregaron 141 μL (0.81 mmol) de DIPEA y tras 10 min se agregaron 352 mg (1.83 mmol) de EDCI. La reacción se dejó evolucionar a t.a durante toda

la noche. La mezcla se diluyó con 20 mL de CH_2Cl_2 y se lavó sucesivamente con HCl 1M (40 mL), con una disolución saturada de K_2CO_3 (40 mL), H_2O (40 mL) y con una disolución saturada de NaCl (40 mL). Se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. Se purificó mediante cromatografía en columna (Hexano/AcOEt 1:1 \rightarrow 1:3). Se obtuvo el compuesto **2**, como un sólido blanco con un rendimiento del 68%. R_F 0.43 (Hexano/AcOEt 1:3). IR (ν_{max}): 3370, 3154, 2966, 2809, 1739, 1684, 1591, 1369, 1215, 1034, 846 cm^{-1} . UV-visible (DMSO): 325 nm. Fluorescencia (DMSO): 389.

^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ ppm, J Hz) δ 10.61 (a, 1H, OH), 8.36 (d, 1H, $J_{\text{N},2} = 9.0$, NH), 7.53 (d, 1H, $J_{\text{H}3',\text{H}2'} = 9.0$, H-3'), 6.75 (dd, 1H, $J_{\text{H}2',\text{H}3'} = 9.0$, $J_{\text{H}2',\text{H}1'} = 2$, H-2'), 6.71 (d, 1H, $J_{\text{H}2',\text{H}1'} = 2$, H-1'), 6.11 (s, 1H, H_a), 5.73 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.5$, H-1), 5.20 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{3,2} = 10$, H-3), 3.87 (t, 1H, $J_{4,3} = J_{4,5} = 10$, H-4), 4.19 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 12$, $J_{6b,5} = 4$, H-6b), 4.05-3.95 (m, 3H, H-2, H-5, H-6a), 3.60 (s, 1H, CH_2), 1.99, 1.96, 1.94, 1.78 (s, 3H, OAc). ^{13}C RMN (75.0 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ ppm,) δ 170.1, 169.6, 169.4 y 168.8 (CO), 155.1-102.4 (aromáticos), 91.7 (C-1), 72.0 (C-2), 71.6 (C-3), 68.6 (C-4), 61.9 (C-6), 52.5 (C-5), 20.5, 20.4, 20.2 (COMe). CIHRMS m/z 490.1378, calculado para $[\text{M-OAc}]^+$: 490.15. $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{NO}_{11}$.

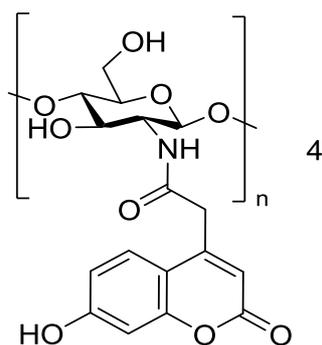
2-[(Cumarin-3-il)carboxamido]quitosano (**3**).



3

A una disolución de quitosano **CS4** (104 mg, 0.62 mmol) en 6 mL de CH_3COOH 0.12 M se agregaron 18 mL de MeOH en los que previamente se había dejado reaccionar durante 30 minutos ácido 3-carboxicumarínico (118.7 mg, 0.62 mmol) y DCC (128.8 mg, 0.62 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a t.a. durante 72 h a pH= 4.70. La elaboración de la reacción se realizó llevando el pH de la solución a 12.1 con NaOH 1M, filtrando y lavando sucesivamente el precipitado con H_2O , MeOH, CH_2Cl_2 y acetona, obteniéndose la amida derivada de quitosano **3** (95 mg, 80%). IR 3273, 2933, 2879, 1678, 1621, 1608, 1565, 1376, 1152, 1028, 816, 782, 764, 747 cm^{-1} . UV-visible (0.17% CH_3COOH): 295 nm. Fluorescencia (0.17% CH_3COOH): 418 nm ^1H RMN (500 MHz, $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$ 1:1, δ ppm): δ = 8.94 (br, 1H, H-4'), 7.88 (a, 2H, H-5' y H-7'), 7.54 (a, 2H, H-6' y H-8'), 4.97 (a, 1H, H-1_{GlcNH-CO-Ar} y H-1_{GlcN}), 4.68 (a, 1H, H-1_{GlcNAc}), 4.50-3.08 (br. m, 7H, H-3, H-4, H-5, H-6_{a,b}, H-2_{GlcNAc}, H-2_{GlcN}). DS 42.0 % (por ^1H RMN). HPLC/SEC(g mol^{-1}): M_n = 47736; M_w = 100245; PDI = 2.10; M_p = 106712.

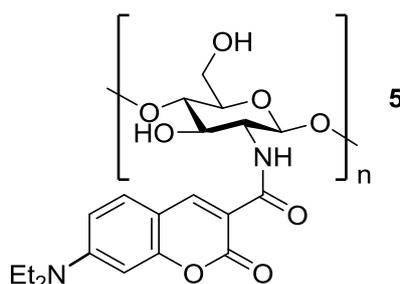
2-[(7-hidroxicumarin-4-il)acetamido]quitosano (**4**).



A una disolución de quitosano **CS5** (100 mg, 0.60 mmol), disuelto en CH_3COOH (ac) (0.12 M) y luego llevado a un pH de 6.2, se añadió ácido 7-hidroxicumarin-4-il-acético (**41**) (89.2 mg, 0.41 mmol) y DCC (88.7 mg,

0.43 mmol). Se realizó a t.a y tras 72 h la reacción se dio por terminada. Se trató con una mezcla MeOH/NH₄OH (7:3) y el sólido formado se lavó sucesivamente con H₂O, MeOH, CH₂Cl₂. Se filtró y se secó a vacío obteniéndose **4** (75 mg, 69.4 %) como un sólido marrón. IR 3273, 2933, 1678, 1622, 1565, 1376, 1028, 816, 765 cm⁻¹. UV-visible (0.17% CH₃COOH): 325. Fluorescencia (0.17% CH₃COOH): 459 nm ¹H RMN (500 MHz, 1% CD₃COOD en D₂O, δ ppm) δ 7.68 (a, 1H, H-5'), 6.97 (a, H-6'), 6.93 (a, H-8'), 6.30 (sa, H-3'), 4.87 (H-1_{GlcN}), 4.30-3.50 (6H, H-2_{GlcNAc}, H-3, H-4, H-5, H-6_{a,b}), 3.19 (H-2). DS 6.7% (por ¹H RMN).

2-[(7-dietilaminocumarin-3-il)carboxamido]quitosano (**5**).

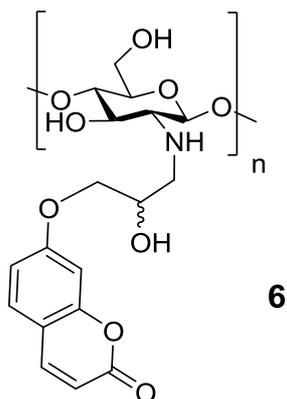


Quitosano **CS4** (104 mg, 0.62 mmol) se disolvió en 6 mL de CH₃COOH 0.12 M y luego se trató con 18 mL de MeOH en el que previamente se había disuelto y dejado reaccionar durante 30 minutos ácido 7-dietilaminocumarin-3-il-carboxílico (163.0 mg, 0.62 mmol) y DCC (128.7 mg, 0.62 mmol). La reacción se realizó a t.a. y se mantuvo durante 72 h a pH= 4.7. La elaboración de la reacción se realizó llevando el pH de la solución a 12.1 con NaOH 1M, filtrando y lavando sucesivamente el precipitado con H₂O, MeOH, CH₂Cl₂ y acetona, obteniéndose la amida derivada de quitosano **5** (100 mg, 74%). IR 3316, 2927, 2851, 1701, 1650, 1625, 1553, 1375, 1252, 1150, 1029, 817 cm⁻¹. UV-visible (0.17% CH₃COOH): 431 nm. Fluorescencia (0.17% CH₃COOH): 465 m. ¹H RMN

(500 MHz, 1% CD₃COOD en D₂O, δ ppm) δ 8.69 (a, 1H, H-4'), 7.65 (d, 1H, $J_{5,6} = 9.1$, H-5'), 6.92 (a, H-6'), 6.67 (sa, H-8'), 4.97 (H-1_{GlcN}), 4.67 (H-1_{GlcNAc}, H-1_{GlcNHCOAr}), 4.40-3.00 [10H, H-2_{GlcNAc}, H-3, H-4, H5, H-6_{a,b}, N(CH₂CH₃)₂, H-2_{GlcNHCOAr}], 3.27 (H-2_{GlcN}). 1.27 (a, 6H)]

DS 11.5% (mediante ¹H RMN). HPLC/SEC(g mol⁻¹): Mn = 52554; Mw = 103006; PDI = 1.96; Mp = 109651.

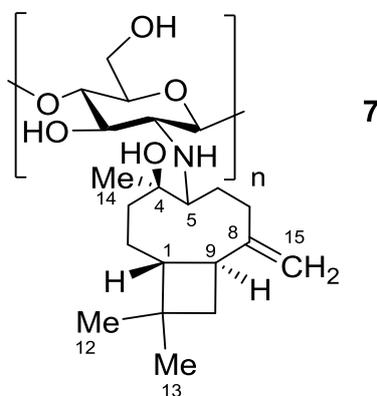
(1→4)-2-[3-(7-cumarinoxi)-2-hidroxiopropanamino]-2-desoxi-β-D-glucano
(**6**).



El quitosano **CS4** (104 mg, 0.62 mmol) se disolvió en 6 mL de CH₃COOH 0.12 M y luego se agregó 18 mL de MeOH en la que previamente se había disuelto el producto 7-(2,3-Epoxipropoxi)cumarina (136.2 mg, 0.62 mmol). La reacción se llevó a 67 °C y se mantuvo durante 72 h tras ajustar el pH hasta pH = 4.7 con NaOH 1M. La elaboración de la reacción se realizó llevando el pH de la solución a pH = 12.1 con NaOH 1M, filtrando y lavando el precipitado con H₂O, MeOH, CH₂Cl₂ y acetona, obteniéndose la hidroxilamina derivada de quitosano **6** (80 mg, 60%). UV-visible (0.17% CH₃COOH): 322 nm. Fluorescencia: (0.17% CH₃COOH): 388 nm. IR ν_{\max} 2358 (Ph), 1559 (N-H protonado), 1409 (C-H δ en el

plano), 1149, 1005 cm^{-1} . ^1H RMN (500 MHz, 1% CD_3COOD en D_2O , δ ppm) δ 8.03 (a, 1H, H-3'), 7.66 (d, 1H, H-5'), 7.05 (a, H-4' y H-6'), 6.42 (a, 1H, H-8'), 5.18 (H-1 $_{\text{GlcNR}}$), 4.98 (H-1 $_{\text{GlcN}}$), 4.67 (H-1 $_{\text{GlcNAc}}$), 4.40-3.00 (12H, CHOH-CH_2 , $\text{CH}_2\text{-OAr}$, H-3, H-4, H-5, H-6 $_{\text{a,b}}$, H-2 $_{\text{GlcNAc}}$, H-2 $_{\text{GlcNR}}$, $-\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.29 (a, 1H, H-2 $_{\text{GlcN}}$). DS 16.8% (mediante ^1H RMN).

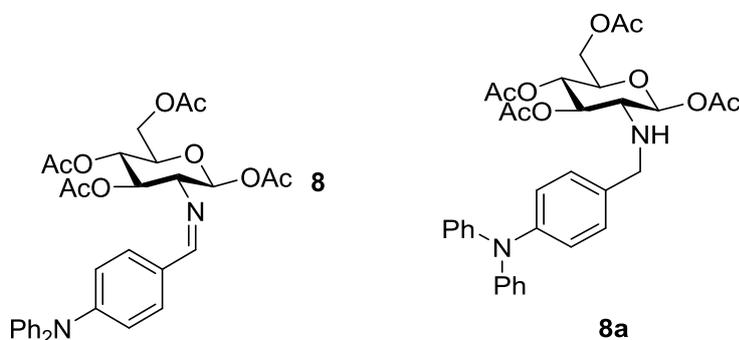
N-(4-hidroxicariofilen-8-il)-quitosano (**7**).



A una disolución de quitosano **CS5** (150 mg, 0.90 mmol), disuelto en CH_3COOH 0.12 M, y luego ajustado a un pH de 6.2, se añadió (-)-óxido de cariofileno (184 mg, 0.84 mmol). Se calentó a 67 °C bajo reflujo y la reacción se siguió por c.c.f. Tras 72 h, se trató con una mezcla $\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (7:3) y el sólido formado se filtró y lavó sucesivamente con H_2O , MeOH y CH_2Cl_2 . Se secó a vacío obteniéndose un producto sólido amarillento al que se asignó la estructura **7**. ^1H RMN (500 MHz, 1 % CD_3COOD , δ ppm) 4.85 (H-1 $_{\text{GlcN}}$), 4.35-3.37 (H-2 $_{\text{GlcNAc}}$, H-3, H4, H5, H-6 $_{\text{a,b}}$), 3.16 (H-2), 2.76 (H-9'), 2.61 (H-5'), 2.34-2.32 (H-1', H-7' y H-10'), 1.80 (H-11'), 1.64 (H-2'), 1.43 (H-3'), 1.28 (CH_3 -14'), 1.01 y 0.99 (CH_3 -12' y 13'). DS 8.0 % (por ^1H RMN)

8.4 Parte Experimental. Bases de Schiff y aminas secundarias derivadas de quitosano como sensores potenciales / Formación de iminas y aminas secundarias derivadas de quitosano

N-(4-*N*-difenilamino)encil-1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (**8a**).



Se disuelve 4-*N*-difenilaminobenzaldehído (51.11 mg, 0.187 mmol) en una mínima cantidad de 1,2 dicloroetano (5mL). Por otro lado, se disuelve Clorhidrato de 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranososa (100 mg, 0.260 mmol) Relación 1/0.72 Glucosamina/Aldehído, en el mismo disolvente y se le añadió DIPEA (0.068mL, 0.391 mmol) para liberar el clorhidrato. En continua agitación, se añadió una sobre la otra y se adicionó triacetoxiborohidruro de sodio (12 mg, 0.200 mmol). La mezcla se dejó reaccionar durante 72 h. El seguimiento se realizó por c.c.f. Para elaborar la reacción se adicionó NaHCO₃ sat (15 mL) y se extrajo la fase acuosa con EtOAc (3x15mL). La fase orgánica combinada se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se purificó en c.c.f usando 4:1 Hexano /AcOEt como eluyente, resultando un producto

cromatográficamente homogéneo que es una mezcla de los compuestos **8b** y **8a** en proporción 3:1. R_F 0.25 (Hexano/AcOEt 4:1)

Compuesto mayoritario 8:

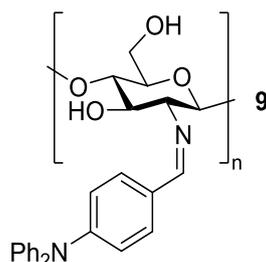
^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J Hz) δ 8.24 (s, 1H, H_{imina}), 7.74-6.88 (m, 14H, $\text{H}_{\text{arOmaticO}}$ s), 6.09 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.1$, H-1), 5.44 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{3,2} = 9.6$, H-3), 4.97 (t, 1H, $J_{4,3} = J_{4,5} = 9.6$, H-4), 4.28-3.90 (m, 3H, H-5, H-6_{ec} y H-6_{ax}), 3.44 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{2,1} = 8.6$, H-2), 2.02, 2.01, 1.99, 1.86 (s, 3H, OAc)

Compuesto minoritario 8a:

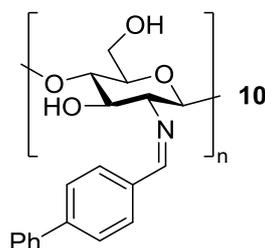
^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J Hz) δ 7.74-6.88 (m, 14H, $\text{H}_{\text{aromaticos}}$), 6.52 (s, 1H, NH) 5.73 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.1$, H-1), 5.07 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{3,2} = 9.6$, H-3), 4.45 (t, 1H, $J_{4,3} = J_{4,5} = 9.6$, H-4), 4.31-3.75 (m, 3H, H-5, H-6_a y H-6_b), 3.55 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{2,1} = 8.6$, H-2), 2.02, 2.01, 1.99, 1.86 (s, 3H, OAc).

Procedimiento general para la síntesis de iminas derivadas de la reacción de quitosano con aldehídos

Los derivados imino fueron sintetizados suspendiendo quitosano CS5 (500 mg, 3.00 mmol) en una solución de CH_3COOH 0.12 M en MeOH a t.a y entonces se trató con el aldehído respectivo (2.1 mmol, 0.7 mol-eq), del aldehído respectivo. El progreso de la reacción se observó utilizando TLC o UV. Después de 24 h el derivado imino se filtró y lavó varias veces con MeOH y CH_2Cl_2 , entonces se secó a vacío durante 24 h.

N-(4-difenilaminobenciliden)quitosano (**9**).

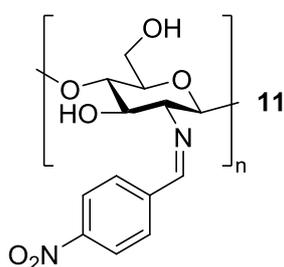
Compuestos de partida: quitosano (300.0 mg, 1.80 mmol) y 4-*N*-difenilaminobenzaldehído (344.4 mg, 1.26 mmol), obteniéndose el compuesto **9** (380 mg, 92 %) como un sólido anaranjado. IR ν_{\max} : 3373, 2876, 1636, 1585, 1488, 1271, 1065, 1025, 825, y 753 cm^{-1} . ^{13}C CPMAS RMN (150.9 MHz, δ ppm): δ = 173.5 (C=O), 162.8 (C=N), 148.9 (C-4'), 145.4 (C-1''), 127.9 (C-1', C-2', C-3', C-2'', C-3'' y C-4''), 102.9 (C-1), 81.2 (C-4), 73.1 (C-3 y C-5), 58.7-56.0 (C-6 y C-2), 23.5 (N-COCH₃). DS: 12.0% (mediante ^{13}C CPMAS RMN).

N-(4-fenilbenciliden)quitosano (**10**).

Aldehído utilizado: bifenilcarboxaldehído (382.7 mg, 2.10 mmol) obteniéndose un sólido blanco (650 mg, 84%). IR ν_{\max} : 3430, 3026, 2881, 1638, 1604, 1487, 1368, 1317, 837, 763, 725, y 695 cm^{-1} . UV-visible

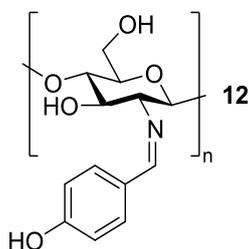
(0.17% CH₃COOH): 300 nm. Fluorescence (0.17% CH₃COOH): 471 nm.
¹³C CPMAS RMN (150.9 MHz, δ ppm): δ = 173.7 (C=O), 168.4 (C=N),
 144.0 (C-4' y C-1''), 133.9 (C-4''), 128.8 (C-2', C-3', C-3'' y C-4''), 104.2
 (C-1), 83.5 (C-4), 75.1 (C-3 y C-5), 61.3 (C-6 y C-2) y 23.5 (N-COCH₃).
 DS: 26.2% (mediante ¹³C CPMAS RMN).

N-(4-nitrobenziliden)quitosano (**11**).



Aldehído utilizado: 4-nitrobenzaldehído (317.5 mg, 2.10 mmol),
 obteniéndose el compuesto **11** (650 mg, 85%) como un sólido amarillo. IR
 ν_{max} : 3373, 2878, 1643, 1600, 1519, 1346, 1313, 1026, 853, 835, 748, 710, y
 688 cm⁻¹. ¹³C CPMAS RMN (150.9 MHz, δ ppm): δ = 174.3 (C=O), 165.1
 (C=N), 149.4 (C-4' y C-1'), 142.3 (C-1'), 130.0 (C-2'), 124.2 (C-3'), 105.1
 (C-1), 83.5 (C-4), 75.6 (C-3 y C-5), 62.3 (C-6 y C-2) y 23.5 (N-COCH₃).
 DS: 31.7% (mediante ¹³C CPMAS RMN).

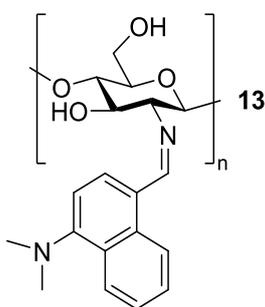
N-(4-Hidroxibenciliden)quitosano (**12**).



Aldehído utilizado: 4-hidroxibenzaldehído (256.5 mg, 2.10 mmol),
 obteniéndose el compuesto **12** (501 mg, 85%), como un sólido marrón claro;

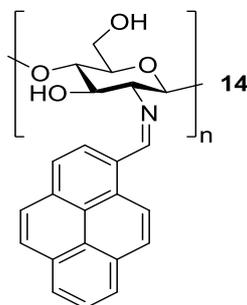
IR ν_{\max} : 3293, 2874, 1636, 1605, 1516, 1372, 1236, 1023, y 833 cm^{-1} . ^{13}C CPMAS RMN (150.9 MHz, δ ppm): δ = 173.2 (C=O), 168.4 (C=N), 160.6 (C-4'), 128.3 (C-2' y C-1'), 117.1 (C-3'), 104.9 (C-1), 84.1 (C-4), 75.5 (C-3 y C-5), 59.9 (C-6 y C-2) y 23.3 (N-COCH₃). DS: 23.8% (mediante ^{13}C CPMAS RMN).

N-(4-dimetilamino1-naftilmetiliden)quitosano (**13**).



Aldehído utilizado: 4-*N*-dimetilaminonaftaldehído (418.4 mg, 2.10 mmol), obteniéndose el compuesto **13** como un sólido anaranjado (642 mg, 85%); IR ν_{\max} : 3385, 2875, 2785, 1635, 1571, 1514, 1373, 1333, 1023, 825, y 764 cm^{-1} . ^{13}C CPMAS RMN (150.9 MHz, δ ppm): δ = 173.7 (C=O), 167.7 (C=N), 154.0 (C-4 y C-1'), 133.4 (C-1'), 126.5 (C-2'), 112.9 (C-3'), 105.2 (C-1), 83.3 (C-4), 75.2 (C-3 y C-5), 61.3 (C-6 y C-2), 57.9 (C-6 y C-2), 44.8 (N(CH₃)₂) y 23.3 (N-COCH₃). DS: 19% (mediante ^{13}C CPMAS RMN).

N-(1-pirenilmetiliden)quitosano (**14**).

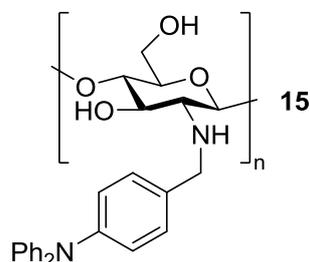


Aldehído de partida: pirencarboxaldehído (483.6 mg, 2.10 mmol), obteniéndose el compuesto **14** como un sólido anaranjado (669 mg, 86%); IR ν_{max} : 3315, 2877, 1623, 1595, 1374, 1026, 847, y 714 cm^{-1} . ^{13}C CPMAS RMN (150.9 MHz, δ ppm): $\delta = 174.3$ (C=O), 165.5 (C=N), 125.7 (Ph), 105.3 (C-1), 83.2 (C-4), 75.3 (C-3 y C-5), 61.3 (C-6), 57.5 (C-2), 23.6 (N-COCH₃). DS: 17.6% (mediante ^{13}C CPMAS RMN).

Procedimiento general para la síntesis de aminas derivadas de la reacción de quitosano con aldehídos.

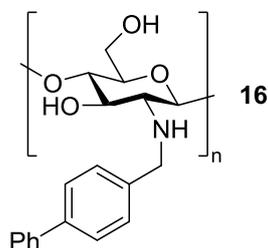
Para el derivado amino, las 24 h iniciales procedieron como se describió para el derivado imino, y se continuó la reacción agregando 2.1 mmol del agente reductor (NaBH₃CN o NaBH₄). El tiempo de reducción se fijó de 24 a 48 h en CH₃COOH 0.12 M en MeOH. La elaboración del derivado se llevó a cabo para eliminar el exceso de aldehído y trazas de NaBH₃CN. La suspensión se trató con HCl 2M hasta que no hubo formación de burbujas, y entonces el precipitado se filtró y se lavó con NaOH (aq) 0.5 M, H₂O, MeOH, y CH₂Cl₂, antes de secarlo a vacío durante 24 h.

N-(4-difenilaminobencil)quitosano (**15**).



Compuestos de partida: Quitosano (300 mg, 1.80 mmol), 4-*N*-difenilaminobenzaldehído (344.4 mg, 1.26 mmol), NaBH₃CN (79.18 mg, 1.26 mmol). Obteniéndose un sólido anaranjado [(386 mg, 92%). IR ν_{\max} : 3351, 3049, 2868, 1644, 1585, 1489, 1274, 1064, 826, 753, y 694 cm⁻¹. UV-visible (0.17% CH₃COOH): 299 nm. Fluorescence (0.17% CH₃COOH): 370 y 455 nm. ¹H RMN (500 MHz, CD₃COOD/D₂O 1:1, δ ppm): δ = 7.35 (br, 8H, H-1', H-2' y H-2''), 7.10 (br, 6H, H-1'' y H-3''), 5.20 (br, 1H, H-1_{GlcNH-CH₂-Ar}), 4.99 (s, 1H, H-1_{GlcN}), 4.67 (br, 1H, H-1_{GlcNAc}), 4.47 (br, 2H, GlcNH-CH₂-Ar), 4.43-3.47 (br. m, 6H, H-2_{GlcNAc}, H-3, H-4, H-5, H-6_{a,b}), 3.27 (br, 1H, H-2_{GlcN}). ¹³C CPMAS RMN (150.9 MHz, δ ppm): δ = 174.8 (C=O), 148.4 (C-4' y C-1''), 130.4 (C-1', C-2', C-3'' y C-4''), 123.6 (C-3' y C-2''), 104.8 (C-1), 82.0 (C-4), 75.6 (C-3 y C-5), 61.3 (C-6), 57.5 (C-2 y NCH₂Ar) y 23.6 (N-COCH₃). DS: 26.0% (mediante ¹H RMN). DS: 13.8% (mediante ¹³C CPMAS RMN).

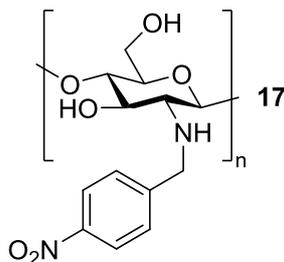
N-(4-fenilbencil)quitosano (**16**).



Aldehído utilizado: bifenilcarboxaldehído (382.7 mg, 2.10 mmol), obteniéndose el compuesto **16** como un sólido blanco (669 mg, 85%); IR

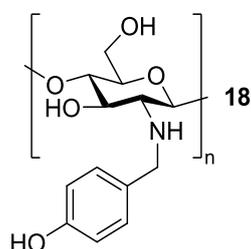
ν_{\max} : 3265, 3026, 2878, 1655, 1487, 1374, 1317, 1062, 826, 762, 735, y 696 cm^{-1} . UV-visible (0.17% CH_3COOH): 256 nm. Fluorescencia (0.17% CH_3COOH): 315 y 456 nm. ^{13}C CPMAS RMN (150.9 MHz, δ ppm): δ = 173.9 (C=O), 140.0 (C-1', C-4' y C-1''), 128.2 (C-2', C-3', C-2'', C-3'' y C-4''), 100.1 (C-1), 83.8 (C-4), 75.0 (C-3 y C-5), 62.1 (C-6), 57.5 (C-2 y NCH_2Ar) y 23.5 (N-COCH₃). DS: 34.4% (mediante ^{13}C CPMAS RMN). HPLC/SEC ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$): M_n = 75800; M_w = 123200; M_p = 99500.

N-(4-nitrobenzil)quitosano (**17**).



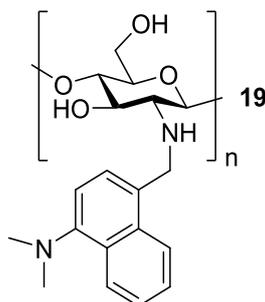
Aldehído utilizado: 4-nitrobenzaldehído (317.5 mg), obteniéndose el compuesto **17** como un sólido amarillo (619 mg, 86%); IR ν_{\max} : 3361, 2871, 1648, 1603, 1515, 1372, 1344, 1061, 1026, 852, 737, 701, y 659 cm^{-1} . UV-visible (0.17% CH_3COOH): 261 nm. ^1H RMN (500 MHz, $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$ 1:1, δ ppm): δ = 8.35 (br, 2H, H-1'), 7.80 (br, 2H, H-2'), 5.16 (br, 1H, H-1_{GlcNH-CH₂-Ar}), 4.98 (s, 1H, H-1_{GlcN}), 4.67 (br, 3H, NCH_2Ar y H-1_{GlcNAc}), 4.43-3.47 (br. m, 6H, H-2_{GlcNAc}, H-3, H-4, H-5, H-6_{ab}), 3.27 (br, 1H, H-2_{GlcN}). ^{13}C CPMAS RMN (150.9 MHz, δ ppm): δ = 173.3 (C=O), 147.3 (C-4' y C-1'), 130.0 (C-2'), 123.6 (C-3'), 105.3 (C-1), 83.2 (C-4), 75.0 (C-3 y C-5), 62.1 (C-6), 56.1 (C-2 y NCH_2Ar) y 23.2 (N-COCH₃). DS: 55.3% (mediante ^1H RMN). DS: 31.7% (por ^{13}C CPMAS RMN). HPLC/SEC ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$): M_n = 70700; M_w = 110400; M_p = 98200.

N-(4-Hidroxibencil)quitosano (**18**).



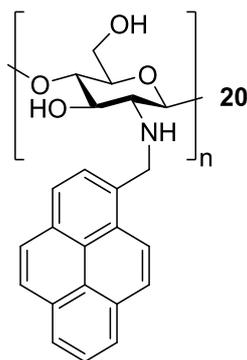
Aldehído utilizado: 4-hidroxibenzaldehído (256.5 mg, 2.10 mmol), obteniéndose el compuesto **18** (530 mg, 80%) como un sólido marrón. IR ν_{max} : 3292, 2874, 1649, 1516, 1453, 1373, 1240, 1062, 1024, 824, y 779 cm^{-1} . UV-visible (0.17% CH_3COOH): 273 nm. ^1H RMN (500 MHz, $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$ 1:1, δ ppm): δ = 7.39 (br, 2H, H-1'), 6.97 (br, 2H, H-2''), 5.12 (br, 1H, H-1 $_{\text{GlcNH-CH}_2\text{-Ar}}$), 4.97 (s, 1H, H-1 $_{\text{GlcN}}$), 4.45 (br, 3H, GlcNH- $\text{CH}_2\text{-Ar}$ y H-1 $_{\text{GlcNAc}}$), 4.43-3.45 (br. m, 6H, H-2 $_{\text{GlcNAc}}$, H-3, H-4, H-5, H-6 $_{\text{a,b}}$), 3.28 (br, 1H, H-2 $_{\text{GlcN}}$). ^{13}C CPMAS RMN (150.9 MHz, δ ppm): δ = 173.9 (C=O), 156.2 (C-4'), 131.4 (C-1' y C-2'), 116.4 (C-3'), 104.9 (C-1), 82.8 (C-4'), 75.0 (C-3 y C-5), 61.2 (C-6), 57.3 (C-2 y NCH_2Ar) y 23.5 (N-CO CH_3). DS: 51.3% (mediante ^1H RMN). DS: 31.4% (mediante ^{13}C CPMAS RMN). HPLC/SEC ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$): M_n = 71000; M_w = 117800; M_p = 95100.

N-(4-dimetilamino-1-naftilmetiliden)quitosano (**19**)



Aldehído utilizado: 4-*N*-dimetilaminonaftaldehído (418.4 mg, 2.10 mmol), obteniéndose el compuesto **19** como un sólido amarillo-naranja (661 mg, 88%); IR ν_{\max} : 2780, 1654, 1579, 1456, 1392, 1372, 1063, 1032, y 769 cm^{-1} . UV-visible (0.17% CH_3COOH): 294 nm. Fluorescence (0.17% CH_3COOH): 330 y 463 nm. ^1H RMN (500 MHz, $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$ 1:1, δ ppm): δ = 8.29 (br, 2H, H-3' y H-6'), 7.97 (br, 1H, H-4'), 7.83 (br, 2H, H-2' y H-5'), 7.82 (br, 1H, H-1'), 5.25 (br, 1H, H-1_{GlcNH-CH₂-Ar}), 4.98 (s, 1H, H-1_{GlcN}), 4.68 (br, 3H, GlcNH-CH₂-Ar y H-1_{GlcNAc}), 4.43-3.47 (br. m, 6H, H-2_{GlcNAc}, H-3, H-4, H-5, H-6_{a,b}), 3.57 [6H, N-(CH₃)₂], 3.29 (br, 1H, H-2_{GlcN}). ^{13}C CPMAS RMN (150.9 MHz, δ ppm): δ = 174.5 (C=O), 151.6 (C-4'), 134.0 (C-5' y C-10'), 126.1 (C-1', C-2', C-6', C-7', C-8' y C-9'), 114.1 (C-3'), 105.0 (C-1), 82.4 (C-4), 75.9 (C-3 y C-5), 61.7 (C-6), 58.5 (C-2 y NCH₂Ar), 45.8 (N(CH₃)₂) y 23.8 (N-COCH₃). DS: 46% (mediante ^1H RMN). DS: 28.6% (mediante ^{13}C CPMAS RMN). HPLC/SEC ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$): M_n = 64100; M_w = 102000; M_p = 115500.

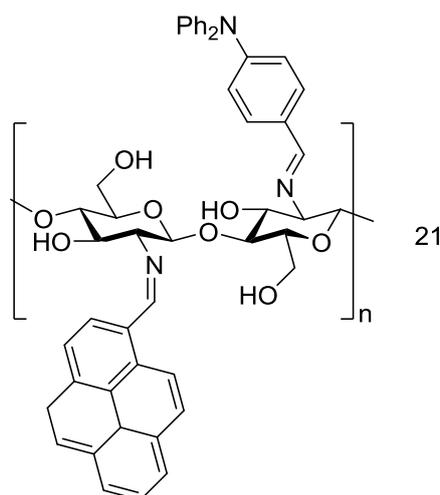
N-(1-pirenilmtilen)quitosano (**20**)



Aldehído de partida: pirencarboxaldehído (483.6 mg, 2.10 mmol), obteniéndose el compuesto **20** como un sólido marrón (617 mg, 86%); IR ν_{\max} : 3299, 2875, 1596, 1375, 1061, 847, y 755 cm^{-1} . UV-visible (0.17%

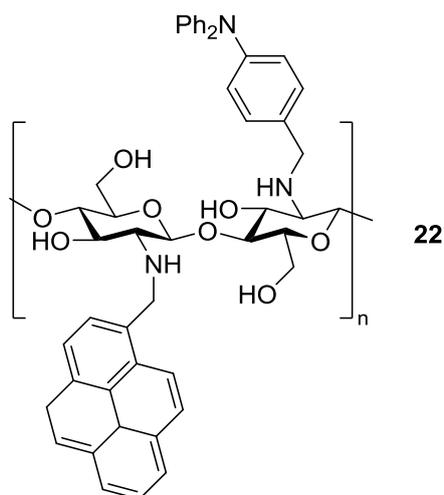
CH₃COOH): 344, 328 y 273 nm. Fluorescence (0.17% CH₃COOH): 379 y 395 nm. ¹³C CPMAS RMN (150.9 MHz, δ ppm): δ = 174.4 (C=O), 126.3 (Ph), 98.0 (C-1), 75.4 (C-4), 72.0 (C-3 y C-5), 61.6 (C-6), 58.1 (C-2 y NCH₂Ar), 24.0 (N-COCH₃). DS: 24.2% (mediante ¹³C CPMAS RMN).

2.4. Preparación del derivado de quitosano **21**: *N*-(1-pirenilmetiliden), *N*-(4-*N*-difenilaminobenciliden), *N*-(4-dimetilamino-1-naftilmetilene)quitosano (**8a**)



Quitosano (500 mg, 3.0 mmol) se suspendió en CH₃COOH metanólico 0.12 M, a t.a. A esta mezcla se le agregó 4-*N*-difenilaminobenzaldehído (274 mg, 1 mmol), pirencarboxaldehído (231 mg, 1 mmol) y 4-*N*-dimetilaminonaftaldehído (200 mg, 1 mmol). Después de 24 h, el derivado imino de quitosano se obtuvo mediante filtración y se lavó con NaOH (aq) 0.5 M, H₂O, MeOH, y CH₂Cl₂, y entonces se secó a vacío durante 24 h obteniéndose el compuesto **21** como un sólido marrón (626 mg, 87.5%); IR ν_{max} : 3352, 2874, 1625, 1585, 1376, 1313, 1025, 847, 757, y 714 cm⁻¹. ¹³C

CPMAS RMN (150.9 MHz, δ ppm): $\delta = 174.0$ (C=O), 167.4 (C=N), 125.7 (C-1'), 125.8 (Ph), 105.2 (C-1), 83.2 (C-4), 75.1 (C-3 y C-5), 57.5-62.2 (C-6 y C-2) y 23.5 (N-COCH₃). DS: 17.2 % para la unidad *N*-pirenbencil y 2.6 % para la unidad *N*-difenilaminobencil (mediante ¹³C CPMAS RMN).

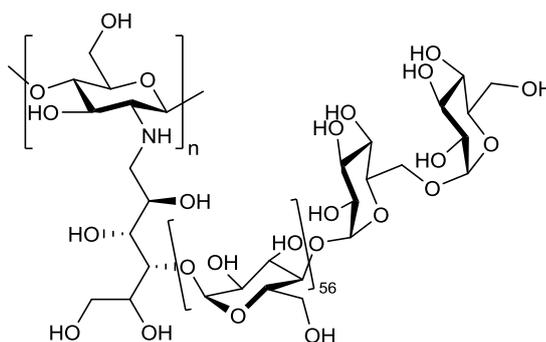


N-(1-pirenilmetylen), *N*-(4-*N*-difenilaminobencil)quitosano (**8b**).

Para el derivado amino, las primeras 24 h procedieron como está descrito para el derivado imino, seguido de la adición de NaBH₃CN (188.5 mg, 3 mmol) y después de 24 h de reducción, HCl 2M se agregó a la suspensión y se dejó reposar hasta que cesara la formación de burbujas. La suspensión se filtró y el producto sólido se lavó con NaOH (aq) 0.5 M, H₂O, MeOH, y CH₂Cl₂, y secado a vacío durante 24 h obteniéndose el producto **22** como un sólido anaranjado. (608 mg, 86.3%); IR ν_{\max} : 3289, 3232, 2870, 1648, 1586, 1509, 1490, 1374, 1057, 1032, 849, 756, y 695 cm⁻¹. UV-visible (0.17% CH₃COOH): 343, 328 y 270 nm. Fluorescence (0.17% CH₃COOH): 379 y 395 nm. ¹³C CPMAS RMN (150.9 MHz, δ ppm): $\delta = 174.8$ (C=O), 167.4 (C=N), 147.5 (C-4), 129.2 (Ph), 97.5 (C-1), 83.2 (C-4), 75.4-71.9 (C-3 y C-5), 58.2 (C-6), 57.3 (C-2 y NCH₂Ar) y 23.6 (N-COCH₃). DS: 12.4% para la

unidad *N*-pirenbencil 5.5 % para la unidad *N*-difenilaminobencil (mediante ^{13}C CPMAS RMN).

Reacción del quitosano con el polisacárido CB10K (23).



23

Se disolvió quitosano **CS3** ($M_w = 86352 \text{ g mol}^{-1}$, DD = 86%) en 1% CH_3COOH y se pasó la solución por una membrana de corte molecular de $100000 \text{ g mol}^{-1}$, tomándose el ultraconcentrado y liofilizándolo durante 72 horas. Se procedió a disolver 5 mg del quitosano liofilizado en 20 mL de una solución de CH_3COOH 0.12 M en $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (1:1), a t.a, y entonces se agregaron 300 mg del polisacárido **CB10K**, un dextrano polimaltosídico principalmente lineal, solamente ramificado en los extremos, concretamente en la posición 6 con glucosa de configuración α con un grado de polimerización (DP) aprox. del 56. Después de 72 h de reacción se agregó un exceso del reductor KBH_4 . Transcurridas 72 h, la solución se dializó con una membrana que permite el paso de moléculas menores de 10000 g mol^{-1}

durante 24 horas a t.a y otras 24 h a 90 °C. Posteriormente, la solución se liofilizó durante 72 h obteniéndose el compuesto **23** (200 mg).

Análisis Elemental: Encontrado: C: 41.30%, H: 6.32%, N: 0.00%;

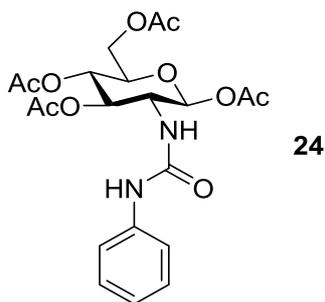
Calculado teóricamente para un grado de incorporación del 100%: C: 44.55%, H: 6.29%, N: 0.14%.

8.5 Parte Experimental. Reacciones de formación de ureas derivadas de quitosano

Procedimiento general para la síntesis de ureas derivadas de 2-amino-1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-desoxi-β-D-glucopiranosas y aril- y alquil-isocianatos.

A una suspensión del compuesto **40** (100 mg, 0.26 mmol) en H₂O (2.5 mL) y tolueno (4 mL) se añadió CaCO₃ (34 mg, 0.34 mmol). La mezcla se agita vigorosamente durante 1 h. El sólido resultante se filtró y se lavó con AcOEt (3 × 3 mL). La suma de las fases orgánicas se secó (Na₂SO₄) y se evaporó hasta sequedad. El sólido blanco resultante se disolvió en CH₂Cl₂ seco (5 mL) y se añadieron los equivalentes en proporción 1:1 del isocianato correspondiente en cada caso. La mezcla se mantuvo a t.a hasta la completa desaparición de los reactivos, monitorizada por c.c.f (eluyente indicado en cada caso).

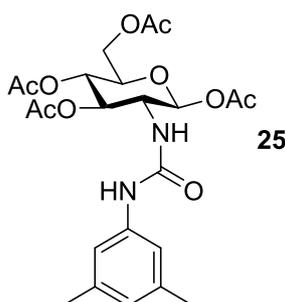
*1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-desoxi-2-(3-fenilureido)-β-D-glucopiranosas (24)*²⁶⁵



²⁶⁵ Fernández-Bolaños, J. G.; García Rodríguez, S.; Fernández Bolaños, J.; Diáñez Millán, M.; López-Castro, A. *Carbohydr. Res.* **1991**, *210*, 125-143.

Fenilisocianato utilizado (28 μL , 0.26 mmol). Tiempo de reacción: 66 h. El sólido se purifica mediante columna cromatográfica (Hexano/AcOEt 1:2) dando lugar al compuesto **24** (96.4 mg, 79 %), como un sólido blanco. R_f (Hexano/AcOEt 1:2): 0.54; ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): δ 7.34-7.28 (4H, m, Ph), 7.10 (1H, m, Ph), 6.77 (1H, s, PhNHCO), 5.79 (1H, d, $J_{1,2}$ 8.7 Hz, H-1), 5.25 (1H, t, $J_{3,4} = J_{3,2}$ 9.3 Hz, H-3), 5.14 (1H, t, $J_{4,3} = J_{4,5}$ 9.6 Hz, H-4), 5.07 (1H, d, $J_{\text{NH},2}$ 9.3 Hz, NHCO), 4.28 (1H, dd, $J_{6a,5}$ 4.7, $J_{6a,6b}$ 12.5 Hz, H-6_a), 4.13 (2H, m, H-6_b y H-2), 3.85 (1H, m, H-5), 2.12, 2.09, 2.05 y 2.03 (3H cada uno, s, OCOCH_3)

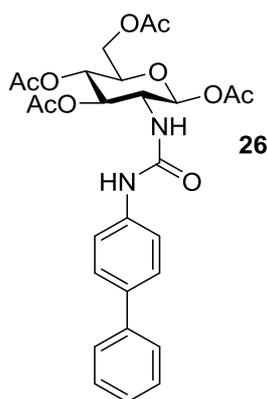
1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-desoxi-2-(3,5-dimetilfenilureido)- β -D-glucopiranososa (**25**).



3,5-Dimetilfenilisocianato utilizado (37 μL , 0.26 mmol). Tiempo de reacción: 40 h. El sólido se purifica mediante columna cromatográfica (Hexano/AcOEt 1:2) dando lugar al compuesto **25** (113.3 mg, 88 %), como un sólido blanco. R_f (Hexano/AcOEt 1:2): 0.49; p.f.: 213-216 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_D^{23}$: -16° (c 1, CH_2Cl_2); IR ν_{max} 1733 (C=O), 1673 (NH-CO-NH), 1556 (C=C arom), 1518 (CH_2), 1220 (CH_3), 1072 (C-O), 1048 (C-O), 1034 (C-O), 914, 904 y 750 (C-H arom) cm^{-1} ; UV-vis (CH_2Cl_2): 242 nm; ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): δ 6.88 (2H, s, H-2' y H-6'), 6.74 (2H, m, H-4' y PhNHCO), 5.79 (1H, d, $J_{1,2}$ 8.7 Hz, H-1), 5.25 (1H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 9.4 Hz, H-3), 5.16-5.10 (2H, m, H-4 y NHCO), 4.28 (1H, dd, $J_{6a,5}$ 4.7, $J_{6a,6b}$ 12.4 Hz, H-6_a), 4.16-

4.07 (2H, m, H-6_b y H-2), 3.84 (1H, m, H-5), 2.27 (6H, s, 2 × CH₃), 2.12, 2.09, 2.06 y 2.02 (3H cada uno, s, OCOCH₃); ¹³C RMN (75.4 MHz, CDCl₃, δ ppm): δ 171.4 (CO), 170.9 (CO), 169.7 (CO), 169.5 (CO), 155.2 (CONH), 139.3, 138.0, 126.2 (C-4'), 119.1 (C-2' y C-6'), 93.1 (C-1), 72.9 (C-5), 72.9 (C-3), 68.2 (C-4), 61.9 (C-6), 54.2 (C-2), 21.4 (PhCH₃), 21.1 (N-COCH₃), 20.9 (COCH₃), 20.9 (COCH₃) y 20.7 (COCH₃); CIHRMS *m/z* 517.1797, calculado para [M+H]: 517.1793. C₂₃H₃₀O₁₀.

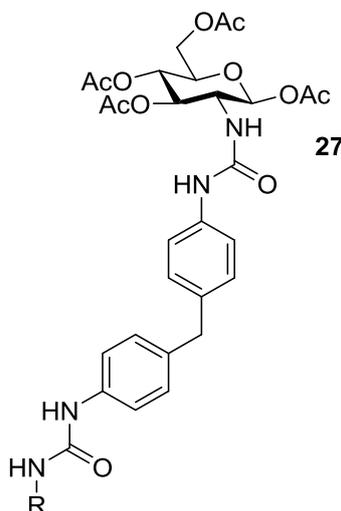
1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-desoxi-2-(4-bifenililureido)-β-D-glucopiranososa (**26**).



4-bifenililisocianato utilizado (50 mg, 0.26 mmol). Tiempo de reacción: 17 h. El sólido se purifica mediante columna cromatográfica (Hexano/AcOEt 1:2) dando lugar al compuesto **26** (111.3 mg, 79 %), como un sólido blanco. R_f (Hexano/AcOEt 1:2): 0.51; p.f.: 198-200 °C; [α]_D²³: +28° (c 1, CH₂Cl₂); IR ν_{max} 1743 (C=O), 1675 (NH-CO-NH), 1538 (C=C_{ar}O_m), 1487 (CH₂), 1216 (CH₃), 1038 (C-O), 1074 (C-O) y 760 (C-H_{ar}O_m) cm⁻¹; UV-vis (CH₂Cl₂): 271 nm; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): δ 7.56-7.29 (9H, m, Ph), 7.05 (1H, s, PhNHCO), 5.80 (1H, d, J_{1,2} 8.7 Hz, H-1), 5.27 (2H, m, H-3 y NHCO), 5.15 (1H, t, J_{4,3} = J_{4,5} 9.6 Hz, H-4), 4.27 (1H, dd, J_{6a,5} 4.7, J_{6a,6b} 12.6 Hz, H-6_a), 4.21-4.10 (2H, m, H-2 y H-6_b), 3.84 (1H, m, H-5), 2.13 (3H,

s, OCOCH_3), 2.07 (6H, s, $2 \times \text{OCOCH}_3$) y 2.02 (3H, s, OCOCH_3); ^{13}C RMN (75.4 MHz, CDCl_3 , δ ppm): δ 171.5 (CO), 170.9 (CO), 169.8 (CO), 169.5 (CO), 155.1 (CONH), 140.5, 137.7, 137.0, 128.9 (Ph), 128.0 (Ph), 127.3 (Ph), 126.9 (Ph), 121.0 (Ph), 93.1 (C-1), 73.0 (C-3), 72.9 (C-5), 68.2 (C-4), 61.9 (C-6), 54.3 (C-2), 21.1 (COCH_3), 20.9 (COCH_3), 20.9 (COCH_3) y 20.7 (COCH_3); CIHRMS m/z 565.1794, calculado para $[\text{M}+\text{H}]$: 565.1793. $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{10}$.

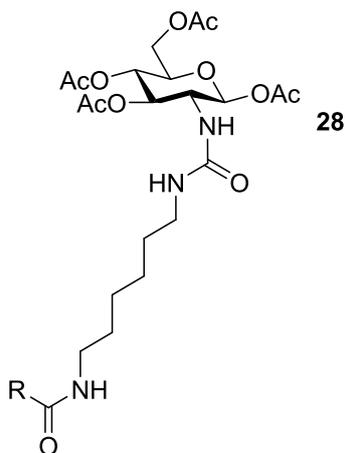
N,N'-Bis(1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi- β -D-glucopiranos-2-il)-4,4'-dicarbamido-difenilmetano (**27**).



4,4'-metilenbis(fenilisocianato) utilizada (33 mg, 0.13 mmol). Tiempo de reacción: 17 h. El residuo obtenido se recristaliza en MeOH para obtener el compuesto **27** (102.6 mg, 82 %) como un sólido cristalino de color blanco. R_f (Hexano/AcOEt 1:6): 0.46; p.f.: 215-218 °C; $[\alpha]_D^{23}$: +10° (c 1, DMSO); IR ν_{max} 1743 (C=O), 1674 (NH-CO-NH), 1545 (C=Carom), 1222 (CH_3), 1083 (C-O), 1039 (C-O), 816 (C-Harom) cm^{-1} ; UV-vis (DMSO): 258 nm; ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ ppm): δ 8.56 (2H, s, PhNHCO), 7.26 (4H, d, $J_{2,3}$ ó $J_{3,2}$ 8.4 Hz, H-2' y H-5' ó H-3' y H-6'), 7.04 (4H, d, $J_{3,2}$ ó $J_{2,3}$ 8.4

Hz, H-3' y H-6' ó H-2' y H-5'), 6.08 (2H, d, $J_{\text{NH},2}$ 9.4 Hz, NHCO), 5.86 (2H, d, $J_{1,2}$ 8.8 Hz, H-1), 5.33 (2H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 9.9 Hz, H-3), 4.89 (2H, t, $J_{4,3} = J_{4,5}$ 9.6 Hz, H-4), 4.18 (2H, dd, $J_{6a,5}$ 4.3 $J_{6a,6b}$ 12.2 Hz, H-6_a), 4.07-3.98 (4H, m, H-6_b y H-5), 3.91 (2H, c, $J_{2,1} = J_{2,3} = J_{2,\text{NH}}$ 9.5 Hz, H-2), 3.75 (2H, s, CH₂), 2.02, 2.01, 1.98 y 1.91 (6H cada uno, s, OCOCH₃); ¹³C RMN (75.4 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): δ 170.0 (CO), 169.7 (CO), 169.3 (CO), 169.0 (CO), 154.6 (NHCO), 138.0, 134.7, 128.8 (C-2' y C-5' ó C-3' y C-6'), 118.0 (C-3' y C-6' ó C-2' y C-5'), 92.2 (C-1), 72.5 (C-3), 71.3 (C-5), 68.3 (C-4), 61.6 (C-6), 52.8 (C-2), 20.6 (COCH₃), 20.5 (COCH₃) y 20.4 (2 × COCH₃).

N,N'-Bis(1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi-β-*D*-glucopiranos-2-il)-1,6-dicarbamido-hexano (**28**).



Hexametildisocianato (22 mg, 0.13 mmol). Tiempo de reacción: 18 h. El sólido se purifica mediante columna cromatográfica (Hexano/AcOEt 1:8 → CH₂Cl₂/MeOH 9:1) obteniéndose el compuesto **28** (102.9 mg, 87%) como un sólido blanco. R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.07; p.f.: 122-125 °C; $[\alpha]_D^{23}$: +8° (c 1, CH₂Cl₂) IR ν_{max} 1744 (C=O), 1645 (NH-CO-NH), 1214 (CH₃), 1070 (C-O), 1033(C-O) cm⁻¹; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): δ 5.72 (2H, d, $J_{1,2}$ 8.8 Hz, H-1), 5.33 (2H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 10.0 Hz, H-3), 5.26 (2H, d, $J_{\text{NH},2}$ 9.6

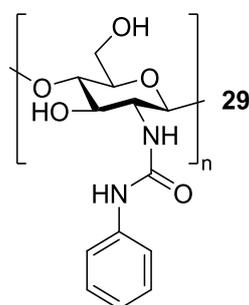
Hz, NHCO), 5.07 (2H, t, $J_{4,3} = J_{4,5}$ 9.8 Hz, H-4), 4.84 (2H, m, CH₂NHCO), 4.27 (2H, dd, $J_{6a,5}$ 5.0, $J_{6a,6b}$ 12.5 Hz, H-6_a), 4.18-4.10 (4H, m, H-6_b y H-2), 3.94 (2H, m, H-5), 3.21 (2H, m, CH_aNHCO), 3.04 (2H, m, CH_bNHCO), 2.12 (6H, s, OCOCH₃), 2.08 (12H, s, OCOCH₃), 2.07 (6H, s, OCOCH₃) y 1.46-1.28 (8H, m, CH₂); ¹³C RMN (75.4 MHz, CDCl₃, δ ppm): δ 172.3 (CO), 170.8 (CO), 169.7 (2 × CO), 157.6 (NHCO), 93.1 (C-1), 74.2 (C-3), 72.7 (C-5), 68.8 (C-4), 62.1 (C-6), 53.9 (C-2), 39.6 (CH₂NHCO), 28.8 (CH₂), 24.9 (CH₂), 21.1 (COCH₃), 21.1 (COCH₃), 20.9 (COCH₃) y 20.7 (COCH₃); CIHRMS *m/z* 885.3207, calculado para [M+H]: 885.3224. C₃₆H₅₄O₂₀.

8.6 Parte Experimental. Reacciones de formación de ureas derivadas de **quitosano**

Procedimiento general para la síntesis de ureas derivadas de la reacción de quitosano con aril isocianatos y aril y alquil diisocianatos.

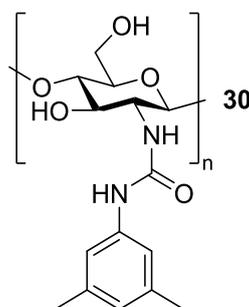
A una suspensión de quitosano comercial de bajo peso molecular [HPLC/SEC ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) $M_n = 48675$; $M_w = 87875$; DD = 86%] en 40 mL de una solución de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:1, se agregó CH_3COOH glacial hasta obtener un pH de 2.9. Luego se alcalinizó hasta un pH= 6.2 con NaOH 4M. Se añadió el isocianato o el diisocianato respectivo en proporción 1:1 molar con respecto al quitosano, salvo se indique lo contrario, y se agitó la mezcla a t.a. hasta que se observó por c.c.f (MeOH como eluyente) absorción a UV (254 nm) en el polímero. La elaboración se realizó llevando el pH de la solución a 12.1 con NaOH 4M, filtrando y lavando el precipitado con H_2O , MeOH, CH_2Cl_2 y acetona, obteniéndose las correspondientes ureas derivadas de quitosano **29-33**.

N-(fenilcarbamoil)quitosano (29).



Compuestos de partida: quitosano (121.0 mg, 0.73 mmol) y fenilisocianato (80 μ l, 1.0 eq/mol). Tiempo de reacción: 21 h, obteniéndose el compuesto **29** (129.8 mg, 92 %) como un sólido blanco. IR ν_{max} : 3286, 2878, 1653, 1594, 1541, 1434, 1370, 1313, 1241, 1061, 899, 753, 698 cm^{-1} . UV-visible (0.17% CH_3COOH): 239 nm. ^1H RMN (700 MHz, $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$ 1:4, δ ppm): δ 7.35 (br, 4H, H2', H3'), 7.14 (br, 1H, H4'), 4.92 (br, 1H, H-1 $_{\text{GlcN}}$), 4.65 (br, 2H, H-1 $_{\text{GlcNH-CO-NH-Ar}}$ y H-1 $_{\text{GlcNAc}}$), 4.30-3.40 (br. m, 8H, H-2 $_{\text{GlcNAc}}$, H-2 $_{\text{GlcNH-CO-NH-Ar}}$, H3-H6), 3.23 (1H, H-2 $_{\text{GlcN}}$). DS (^1H RMN) 22.5 %.

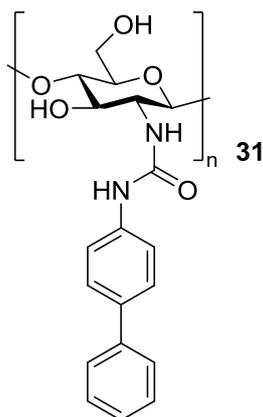
N-(3,5-dimetilfenilcarbamoil)quitosano (**30**).



Compuestos de partida: quitosano (143.7 mg, 0.86 mmol) y 3,5-dimetilfenil isocianato (140 μ l, 1.16 eq/mol). Se agitó la mezcla durante 94 h obteniéndose el compuesto **30** (144.4 mg, 84 %). IR ν_{max} : 3301, 2866, 1662, 1637, 1610, 1561, 1432, 1303, 1231, 1151, 1061, 1031, 883, 840, 684 cm^{-1} . UV-visible (0.17% CH_3COOH): 243 nm. ^1H RMN (700 MHz,

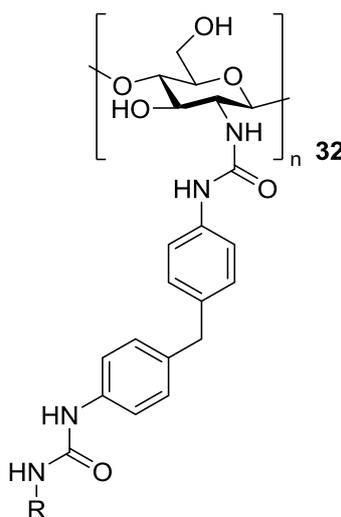
CD₃COOD/D₂O 1:4, δ ppm) δ 6.96 (br, 2H, H-2'), 6.78 (br, 1H, H-4'), 4.92 (br, 1H, H-1_{GlcN}), 4.64 (br, 2H, H-1_{GlcNH-C_{NH}-Ar} y H-1_{GlcNAc}), 4.40-3.40 (a, 8H, H-2_{GlcNAc}, H-2_{GlcNH-C_{NH}-Ar} y H3-H6), 3.23 (br, 1H, H-2_{GlcN}), 2.26 (CH₃)_{2Ar}. ¹³C CPMAS RMN (150.9 MHz, δ ppm): δ 174.4 (C=O), 158.2 (C=O_{urea}), 139.5 (C-1', C-3'), 126.4 (C-2'), 116.8 (C-4'), 104.5 (C-1), 75.3 (C-4, C-3, C-5), 59.1 [(CH₃)_{2Ar}, C-2], 21.6 (, N-COCH₃). DS 20.5% (¹H RMN), 19.4% (¹³C CPMAS RMN, *I*_{Ar}), 34.0% (¹³C CPMAS RMN, *I*_{CH₃Ar}).

Reacción del quitosano con el 4-bifenilil isocianato. Preparación de del N-(bifenilmetilencarbamoil)- quitosano N,N'-Bis [(1→4)-2-desoxi-β-D-glucanil]-4,4'-dicarbamidodifenilmetano (31).



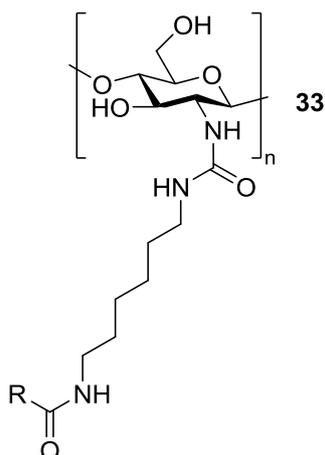
Compuesto de partida: quitosano (122.2 mg, 0.73 mmol) y 4-bifenilil isocianato (147.5 mg, 1.0 eq/mol). Tiempo de reacción: 72 h obteniéndose el compuesto **31** (129.2 mg, 94.0%). IR ν_{\max} 3377, 2870, 1650, 1591, 1575, 1542, 1375, 1239, 1152, 1065, 1026, 901, 836, 760 cm⁻¹. UV-visible (0.17% CH₃COOH): 270 nm. ¹H RMN (700 MHz, CD₃COOD/D₂O 1:4, δ ppm) δ 7.64 (br, 4H, H-2', H-2''), 7.48 (br, 4H, H-3', H-3''), 7.38 (br, 1H, H-4''), 4.91 (br, 1H, H1_{GlcN}), 4.67 (br, 1H, H1_{GlcNAc}), 4.62 (br., 1H, H1_{GlcNH-C_{NH}-Ar}), 4.30-3.40 (br. m, 8H, H-2_{GlcNAc}, H-2_{GlcNH-CONH-Ar}, H3-H6), 3.22 (br, 1H, H2_{GlcN}). Sólido blanco. DS 9.6 % (¹H RMN).

Reacción del quitosano con el diisocianato de 4,4'-metilendifenilo.
Preparación de *N,N'*-Bis [(1→4)-2-desoxi-β-D-glucanil]-4,4'-dicarbamidodifenilmetano (**32**).



Compuesto de partida: quitosano (120.0 mg, 0.72 mmol) al cual se le añadió CH_3COOH glacial hasta un $\text{pH} = 3.2$ previo al ajuste de la reacción a $\text{pH} = 6.2$ y diisocianato de 4,4'-metilendifenilo (238 μl , 3.04 mol/eq). Tiempo de reacción: 117 h, obteniéndose el compuesto **32** (110 mg, 85 %). IR ν_{max} 3364, 2873, 1654, 1601, 1542, 1513, 1375, 1315, 1062, 1029, 813.8 cm^{-1} . UV-visible (0.17% CH_3COOH): ^1H RMN (700 MHz, $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$ 1:4, δ ppm), δ ppm δ 7.31 (br, 4H, H-2'), 7.18 (br, 4H, H-3'), 4.93 (br, 1H, H-1_{GlcN}), 4.62 (br, 2H, H-1_{GlcNH-CONH-Ar}, H-1_{GlcNAc}), 3.94-3.40 (br. m, 8H, H-2_{GlcNAc}, H-2_{GlcNH-CONH-Ar}, H3-H6), 3.24 (br, 1H, H2_{GlcN}). ^{13}C CPMAS RMN (150.9 MHz, δ ppm): δ 174.2, (C=O), 158.3 (C=O_{urea}), 137.4-118.1 (Ph), 105.3 (C-1), 82.6 (C-4), 75.4 (C-3, C-5), 58.2 (C-6, C-2), y 40.7 (-CH₂). Sólido blanco. 5.8 % (^1H RMN), 2.2-3.0 % (^{13}C CPMAS RMN).

Reacción del quitosano con el 1,6-diisocianatohexano. (**33**). *N,N'*-Bis-[(1→4)-2-desoxi-β-D-glucanil]-1,6-dicarbamidohexano



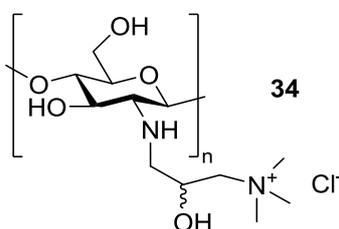
Compuesto de partida: quitosano (121 mg, 0.73 mmol) y diisocianato de 1,6-hexametileno (233 μl , 3.97 eq/mol). Tiempo de reacción: 86 horas obteniéndose el compuesto **33** (149.8 mg, 95%), insoluble en una solución ácida diluida. Rto. 97 %. IR ν_{max} : 3292, 2928, 2865, 1648, 1558, 1508, 1437, 1371, 1257, 1146, 1024, 899, 656 cm^{-1} . UV-visible NS. ^{13}C CPMAS RMN (150.9 MHz, δ ppm): δ 173.4 (C=O), 160.3 (C=O_{urea}), 103.9 (C-1), 82.9 (C-4), 75.2 (C-3 y C-5), 61.9 (C-6), 59.9 (C-2), 41.1 (C-1'), 30.6 (C-2'), 27.9 (C-3'), 21.6 (N-COCH₃). Sólido blanco. DS 29.2 % (^{13}C CPMAS RMN, I_{C=O_{urea}}). 43.6 % (^{13}C CPMAS RMN, I_{C_{alifáticos}}).

8.7 Parte Experimental Formación de derivados de quitosano cuaternizados

Reacción de quitosano con el cloruro de glicidiltrimetilamonio (GTMAC).

Síntesis de N-[(2-hidroxi-3-trimetilamonio)propil]-quitosano (34).

Procedimiento A.



Se realizó la síntesis utilizando el procedimiento descrito por Loubaki, et al.²⁶⁶ con modificación. Se disolvió el quitosano **CS4** (153 mg, 0.92 mmol) en 22.5 mL de AcOH 20% tras agitación durante 10 minutos. Se diluyó con 13.5 mL de H₂O destilada. A continuación se filtró y se añadió una solución de NaOH con agitación débil hasta pH= 7. Se precipitó el quitosano totalmente mediante la adición de acetona (90 mL) y se filtró y lavó con acetona. Se procedió dispersando este sólido en 10-15 mL de H₂O destilada y se añadió 750 µl de GTMAC (5.59 mmol). La suspensión se agitó a 60 °C durante 24 h. Se agregó a la solución CH₃COOH hasta un pH de 3.2 y se precipitó la solución con acetona hasta la obtención del compuesto **34**_{CS4} (110.0 mg, 55%) como un sólido blanco IR ν_{max} : 3293, 2880, 1647, 1557, 1476, 1373, 1311, 1149, 1065, 1027, 908, 713 cm⁻¹. ¹H RMN (700 MHz, CD₃COOD/D₂O 1:4, δ ppm): δ 4.67 (a, 2H, CH-OH_{cuat} y H-1_{GlcNAc}), 4.49-3.00 (a, 8H, H3-H6, H-2_{GlcNAc}, H-2_{GlcN}, NH-CH₂_{cuat} y H-2_{GlcNR}), 3.55 [a, 2H,

²⁶⁶Loubaki, E.; Sicsic S.; Le Goffic, F. *Eur. Polym. J.* **1989**, 25, 379-384.

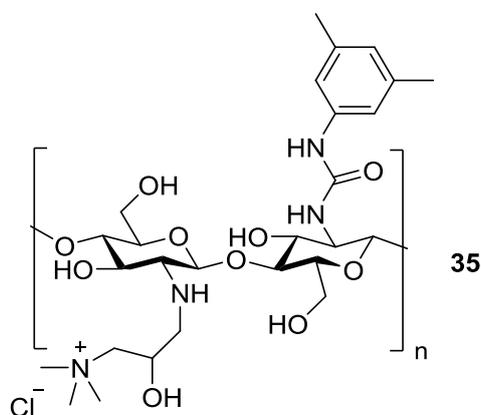
CH(OH)-CH_{2cuat}], 3.29 [br, 9H, N⁺(CH₃)₃], ¹H RMN (300 MHz, 0.16 % DCI, δ ppm): δ 5.10. (br, 1H, H-1_{GlcNcuat}), 4.69 (br, 2H, CHOH_{cuat} y H1_{GlcNAc}), 4.38-2.87 (br, 8H, H-2_{GlcNAc}, H-2_{GlcNcuat} y H3-H6), 3.57 [(br, 2H, (CH₃)₃N⁺CH_{2cuat})], [3.27, N⁺(CH₃)₃], 2.56 (1H, H-2_{GlcNR}), 2.07 (br, 3H, COCH₃). ¹H RMN (300 MHz, D₂O, δ ppm): δ 4.32 (br, 2H, CH-OH_{cuat} y H-1_{GlcNAc}), 4.19-3.53 (br, 5H, H3-H6), 3.43 [(br, 2H, (CH₃)₃N⁺CH_{2cuat})], 3.23 [br, 9H, N⁺(CH₃)₃], 3.03-2.66 (br, 2H, NH-CH_{2a cuat}), 2.90 (br, 1H, H-2_{GlcN}), 2.56 (1H, H-2_{GlcNR}), 2.07 (br, 3H, COCH₃). DS (¹H RMN en D₂O) 33.8 %.

Procedimiento B.

Se suspendió el quitosano **CS3** (150 mg, 0.9 mmol) en 5 mL de una solución metanólica de CH₃COOH 0.12 M con agitación de 600 rpm, se agregó el cloruro de glicidiltetrametilamonio (GTMAC) (393 μl) y se agitó la suspensión a 60 °C durante 24 horas a pH= 3.7. La reacción se monitorizó por FT-IR, observando la aparición de la banda a 1476 cm⁻¹.²⁶⁷ La suspensión se filtró y lavó 5 veces con una mezcla de MeOH:H₂O 10:1 y luego acetona obteniéndose el compuesto **34**_{CS3} (196.2 mg, 83%) como un sólido blanco. IR ν_{\max} : 3293, 2880, 1647, 1557, 1476, 1373, 1311, 1149, 1065, 1027, 908, 713 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, D₂O, δ ppm): δ, 4.57 (br, 1H, H-1_{GlcNR}), 4.32 (br, 2H, CH-OH_{cuat} y H-1_{GlcNAc}), 4.19-3.53 (br, 5H, H3-H6), 3.42 (br, 2H, (CH₃)₃N⁺CH_{2cuat}), 3.23 [br, 9H, N⁺(CH₃)₃], 2.95 (br, 1H, NH-CH_{2a cuat}), 2.81 (br, 1H, NH-CH_{2b cuat}), 2.57 (br, 1H, H-2_{GlcNR}), 2.06 (br, 3H, COCH₃). DQ (¹H RMN) 63.5%.

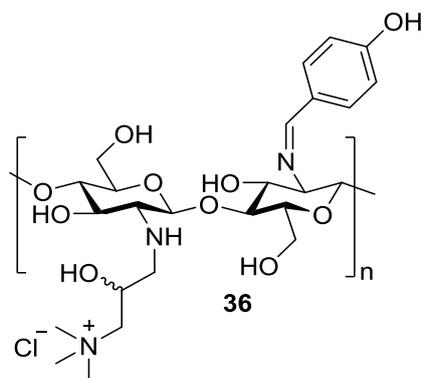
Síntesis de N-(3,5-dimetilfenilcarbamoil), N'-[(2-hidroxi-3-trimetilamonio)propil]quitosano (35).

²⁶⁷ El seguimiento de la reacción se realizó tomando una alícuota de la reacción, lavando la suspensión en MeOH:H₂O 10:1 y observando la banda mencionada.



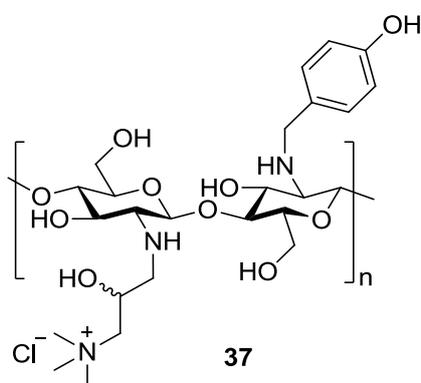
Se preparó una disolución de la urea **30** (130 mg) en CH_3COOH al 30 % (34 mL) y se diluyó con H_2O (20 mL). Se añadió NaOH 4 M hasta $\text{pH} = 7.0$ y se precipitó la urea mediante la adición de 100 mL de acetona, filtrándose y lavándose con acetona, hasta obtener un sólido blanco. Este sólido se dispersó en 15 mL de H_2O y se añadieron 750 μl (5.59 mmol) de GTMAC y la mezcla se calentó a 60 °C durante 24 horas. Se agregó a la solución CH_3COOH hasta un pH de 3.2 y se precipitó con acetona hasta la obtención del producto **35** (112 mg, 61.8%) como un sólido blanco. IR ν_{max} : 3304, 2910, 1648, 1610, 1560, 1473, 1374, 1329, 1236, 1029, 837, 740 cm^{-1} . UV-visible (0.17% CH_3COOH): 243 nm. ^1H RMN (700 MHz, $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$ 1:4, δ ppm) δ 6.97 (br, 2H, H-2'), 6.79 (br, 1H, H-4'), 4.67 (br, 3H, $\text{CH-OH}_{\text{cuat}}$, H-1 $_{\text{GlcNAc}}$ y H1 $_{\text{GlcNH-C}_{\text{NH-Ar}}}$), 4.38-3.01 (br. m, 8H, H3-H6, H-2 $_{\text{GlcNAc}}$, NH- $\text{CH}_2_{\text{cuat}}$ H-2 $_{\text{GlcN}}$, H-2 $_{\text{GlcNcuat}}$), 3.52 (br, 2H, $\text{CHOH-CH}_2_{\text{cuat}}$), 3.29 [br, 9H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$], 2.27 [$(\text{CH}_3)_2$]. δ 174.2 (C=O), 158.3 (C=O $_{\text{urea}}$), 139.5 (C-1', C-3'), 126.4 (C-2'), 116.8 (C-4'), 104.4 (C-1), 95.0-50.0 [C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, $\text{CHOH}_{\text{cuat}}$, NH- $\text{CH}_2_{\text{cuat}}$, $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2_{\text{cuat}}$], 55.1 $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, 21.7 (PhCH_3 , NCOCH_3). DS 20.5% (^1H RMN), 19.4% (^{13}C CPMAS RMN, ICAr), DQ 41.0 % (^{13}C CPMAS RMN). DQ 45.8% (^1H RMN).

Preparación del *N*-(4-hidroxibenciliden), *N'*-[(2-hidroxi-3-trimetilamonio)propil]quitosano (**36**).



El compuesto **34**_{CS3} (120 mg) se suspendió en una solución de CH₃COOH en MeOH 0.12 M a t.a. (pH= 3.7) y luego se trató con 4-hidroxibenzaldehído (85.0 mg, 0.49 mmol). El progreso de la reacción se monitorizó por la formación de un sólido marrón. Después de 24 h el imino derivado se filtró y lavó cinco veces con MeOH:H₂O 9:1 y acetona para eliminar el GTMAC sin reaccionar y se secó vacío durante 24 h, resultando el producto **36** como un sólido marrón claro (118.0 mg, 94%). IR ν_{max} : 3265, 1648, 1559, 1475, 1418, 1375, 1310, 1148, 1062, 1032, 965, 919, 684 cm⁻¹. UV-visible (H₂O): 274 nm. ¹H RMN (300 MHz, D₂O, δ ppm): δ 9.58 (br, 1H, HC=N), 7.80 (br, 2H, H2'), 6.83 (br, 2H, H3'), 4.30 (br, 2H, CH-OH_{cuat} y H-1_{GlcNAc}), 4.16-3.50 (br, 5H, H3-H6), 3.41 (br, 2H, CHOH-CH₂_{cuat}), 3.23[br, 9H, N⁺(CH₃)₃], 3.03-2.66 (br, 2H, NH-CH₂_{cuat}), 2.56 (br, 1H, H-2_{GlcN}), 2.06 (br, 3H, COCH₃). DQ (¹H RMN) 63.5%, DS (¹H RMN) 7.2%.

Formación de *N*-(4-hidroxibencil), *N'*-[(2-hidroxi-3-trimetilamonio)propil]quitosano (**37**).



En la formación del producto **37**, las 24 h iniciales procedieron como se ha descrito en el apartado anterior para la síntesis del imino derivado **36**, y entonces la reacción se continuó mediante el tratamiento de la misma con el agente reductor NaBH_3CN (31.0 mg, 0.49 mmol) durante 24 horas en CH_3COOH 0.12 M en MeOH, a $\text{pH} = 3.7$. La suspensión se trató con HCl 2M hasta que no hubo formación de burbujas, y entonces el precipitado se filtró y lavó con NaOH (aq) 0.5 M, $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (1:9), MeOH, y CH_2Cl_2 y se secó a vacío durante 24 h obteniéndose el producto **37** (116.2 mg, 89%) como un sólido blanco. IR ν_{max} : 3267, 1648, 1559, 1475, 1418, 1375, 1310, 1148, 1062, 1032, 965, 919, 684 cm^{-1} . UV-visible (0.17% CH_3COOH): 284 nm.

^1H RMN (300 MHz, D_2O , δ ppm): δ 7.31 (br, 4H, H2'), 6.92 (br, 1H, H3'), 4.56 (br, 1H, H-1_{GlcNR}), 4.32 (br, 2H, $\text{CH-OH}_{\text{cuat}}$ y H-1_{GlcNAc}), 3.98, 4.19-3.53 (br, 5H, H3-H6), 3.42 (br, 2H, $\text{CHOH-CH}_2\text{cuat}$), 3.23 [br, 9H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$], 2.95 (br, 1H, $\text{NH-CH}_2\text{cuat}$), 2.81 (br, 1H, $\text{NH-CH}_2\text{cuat}$), 2.57 (br, 1H, H-2_{GlcN}), 2.07 (br, 3H, COCH_3). DQ 63.5 % (^1H RMN). DS 11.8%.

8.8 Parte Experimental. Aplicaciones

8.8.1 Preparación de films de quitosano.

Distintas muestras de quitosano (500 mg) de peso molecular bajo y medio[($M_w = 42400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, DD = 87%); **CS1**], ($M_w = 86352 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, DD = 86%; **CS3**), ($M_w = 160253 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, DD = 83%); **CS6**] se trataron con 25 ó 50 mL de una disolución de CH_3COOH al 1%. La mezcla se agitó a 800 rpm hasta disolución completa, se filtró el material en suspensión y se desgasificó con N_2 a 1 atm. Se vertió la solución viscosa sobre el plato de microondas y se procedió a irradiar a 700 W durante 10 minutos y luego se enfrió durante 5 minutos, repitiendo el ciclo hasta eliminar todo el H_2O . El film resultante se lavó superficialmente con MeOH y se desprendió de la superficie del microondas.²⁶⁸ Se obtuvieron así los films de quitosano que denominaremos **FCS1**, **FCS3** y **FCS6**. Estos films se sumergieron en una solución metanólica de NaOH 0.1M y después se lavaron sumergiéndolos sucesivamente en H_2O , MeOH y acetona y se dejaron secar a t.a o en horno a 60°C previo al análisis mediante SEM, microscopio confocal, FT-IR, para el estudio de sus propiedades mecánicas o para su modificación posterior.

Preparación de films de derivados de quitosano.

El film **FCS3** (450 mg) previamente preparado por el procedimiento anterior se sumergió en una disolución de CH_3COOH 0.12M en metanol en

²⁶⁸ También se prepararon films de quitosano sin neutralizar con solución metanólica de NaOH 0.1M para los ensayos de solubilidad y para el análisis mediante FT-IR.

la que previamente se habían disuelto 0.4 moles del aldehído correspondiente (4-nitrobenzaldehído, 4-hidroxibenzaldehído o bifeníl-4-carboxaldehído) y se agitó cuidadosamente durante 24 horas a temperatura ambiente. Se procedió a lavar el film varias veces con MeOH y CH₂Cl₂ y se dejó secar a temperatura ambiente o en horno a 60 °C para su análisis posterior. Se obtuvieron así los films de derivados de quitosano que denominaremos **BFCS3**, **NFCS3** y **HFCS3**.

Ensayos de solubilidad de los films de quitosano y sus derivados.

Los films de quitosano y de sus derivados obtenidos fueron sumergidos en H₂O o en soluciones de CH₃COOH al 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 %. En cada caso se comprobó su la solubilización o integridad del film después de 24 y 48 horas de estar sumergido.

Visualización de la morfología de los films de quitosano y derivados en el microscopio electrónico de barrido.

Una muestra de film de 30 mg aprox. y 0.5 cm² se metalizó con oro en un equipo Edwards Pirani 501 a un vacío de 10⁻² mbar con una corriente de 22 mA durante 120 s. Entonces la muestra fue observada en un microscopio electrónico de barrido Phillips modelo XL30 con una distancia de trabajo de 15.4 mm, bajo un voltaje de aceleración de 20 kV, tomando imágenes con magnificaciones de 100x hasta 10000x.

Visualización de la morfología de los films en el microscopio confocal.

Muestras previamente secadas en el horno a 60 °C de una membrana de diálisis de Sigma-Alrich (dialysis sacks, M_wCO 12000 g·mol⁻¹) y del film preparado según se describió más arriba a partir de quitosano y

bifenilcarboxaldehído, **BFCS3**, fueron observadas en el microscopio confocal ZEISS Duo utilizando el software Sensoscan con visualizaciones en perfil, en contorno e isométrico con los objetivos EPI 10XN y EPI 20XN y un barrido entre 126 y 200 μm para un área del objeto máximo de 1.75 x 1.32 mm^2 .

Medición del espesor de los films.

El espesor de los films se midió con una precisión de ± 0.001 mm con un micrómetro digimático palmar (QuantuMike Mitutoyo). Los valores obtenidos fueron el resultado del promedio de 5 mediciones realizadas cada una de ellas en distinta posición a lo largo del film.

Determinación de las propiedades mecánicas de films de quitosano y sus derivados.

La medición de las propiedades mecánicas de tensión y deformación a la ruptura se realizó en un sistema de testado electromecánico (MTS Insight 10) equipado con el software TestWorks 4.0. Este equipo consiste en un bastidor rectangular con una célula de carga que se desplaza verticalmente entre las dos columnas, conducido por el movimiento de los tornillos de bola con los que se conecta a las columnas. Las probetas se sujetan al sistema por dos mordazas (Figura 50). Al iniciar el ensayo el extremo inferior de la probeta queda fijo, conectado a la base por la mordaza inferior, mientras el extremo superior es arrastrado por el cabezal sujeto a la otra mordaza, extendiendo así la probeta. Cuando el equipo detecta el umbral de ruptura el ensayo se detiene. Durante el ensayo se mide carga y desplazamiento en función del tiempo. Los ensayos de tracción se realizan sobre al menos 4 especímenes por sistema quintuplicados a una temperatura

de 23 °C y una humedad relativa del 38-42 %, empleando probetas definidas por la norma ISO 527-2.



Figura 50. sistema de testado electromecánico (MTS Insight 10) utilizado.

8.8.2 Actividad antimicrobiana.

Para todos los ensayos de actividad antimicrobiana se utilizaron tres cepas de bacterias: *Escherichia coli* (CECT 101), *Klebsiella pneumoniae* (CECT 143) y *Salmonella typhimurium* (CECT 443) obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipos²⁶⁹. Todas las disoluciones y el material utilizado para los ensayos fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Cada asa de digralski fue de uso único y estuvo guardada en un plástico sellado previo a los ensayos de actividad antimicrobiana.

Preparación de muestras para ensayos microbiológicos en platos de agar nutritivo.

Los muestras de quitosano **CS1** ($M_w = 42400 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, DD = 87%), **CS3** ($M_w = 86352 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, DD = 86%), y **CS6** ($M_w = 160253 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, DD = 83%), y las aminas secundarias derivadas de quitosano **16**, **17**, **18** y **19**, resultado de las reacciones entre el quitosano **CS5** ($M_w 97600 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, DD = 87%) y los aldehídos 4-bifenilcarboxaldehído, 4-nitrobenzaldehído, 4-hidroxibenzaldehído, ó 4-*N,N*-dimetilamino-1-naftaldehído, respectivamente–se secaron en el horno a 60 °C durante 4 horas y fueron manipulados estérilmente antes de su disolución. Todas las se disolvieron en 25% de CH_3COOH y luego se diluyeron con H_2O , previamente esterilizada en autoclave, hasta obtener disoluciones de una concentración de 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para los ensayos con *Escherichia coli*, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para los ensayos con *Klebsiella pneumoniae* y 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para los ensayos con *Salmonella typhimurium*. A continuación, se llevó el pH de la muestra a 5.5 con NaOH

²⁶⁹ Colección Española de Cultivos Tipos. Universidad de Valencia. <http://www.uv.es/cect>. (visitado 26 de febrero del 2015).

0.4 M. El control no contenía ni quitosano ni derivado y se preparó empleando CH₃COOH al 25 %, H₂O esterilizada en autoclave y luego ajustando el pH a 5.5 con NaOH 0.4 M.

Actividad antimicrobiana del quitosano y aminos secundarios derivadas de quitosano en disolución.

La actividad antimicrobiana del quitosano y de aminos secundarios derivadas de quitosano se determinó utilizando el procedimiento de Mengibar et al.,²⁷⁰ con modificación. Los cultivos de cada cepa se prepararon como sigue: las muestras congeladas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhimurium* fueron inoculadas en 50 ml de caldo nutritivo en un matraz de 100 ml. Estos cultivos fueron incubados a 38 °C durante 48 horas, en una incubadora Incubig de 720 L. Las células bacterianas fueron diluidas 1:100 en 50 ml de caldo nutritivo fresco y dejadas crecer durante 18 a 24 h, hasta la fase exponencial tardía. Un mL del cultivo bacteriano en fase exponencial (10⁶ CFU/mL) se mezcló con 1 ml de disolución de quitosano **CS1**, **CS3**, **CS6**, y derivados de quitosano **16**, **17**, **18**, **19**, o el control preparados como se mencionó previamente. La concentración final de quitosano o de derivado para cada ensayo fue de 300 µg/mL para *Escherichia coli*, 500 µg/mL para *Klebsiella pneumoniae* y 1000 µg/mL para *Salmonella typhimurium*. Las muestras fueron incubadas durante 24 h a 38 °C. Después de la incubación, diluciones decimales seriadas fueron preparadas con solución salina (0.9%) y 0.1 mL de la tercera a la sexta o séptima dilución fueron distribuidos homogéneamente en placas de agar nutritivo (Scharlau) y cada una de estas

²⁷⁰ Mengibar, M.; Ganan M.; Miralles, B.; Carrascos, A. V.; Martínez-Rodríguez A. J.; Peter, M. G.; Heras, A. *Carbohydr Polym.* **2011**, *84*, 844–848.

diluciones se realizó en triplicados. Pasadas las 24 horas de incubación, se determinó el número de unidades formadoras de colonias (CFU) y la actividad antimicrobiana se expresó como % de inhibición del crecimiento con respecto al control.

Pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano de muestras sólidas de quitosano y sus derivados y de films de quitosano.

Bacterias *Escherichia coli* (CECT 101), *Klebsiella pneumoniae* (CECT 143), o *Salmonella typhimurium* (CECT 124) se extrajeron de las placas de agar de cultivo que las contenían y se transfirieron con asa a un tubo con caldo de medio nutritivo. Los inóculos se incubaron a 37 °C durante 24 h y tras la contabilización de CFU se realizaron las diluciones seriadas correspondientes con solución salina al 0.9% para obtener una concentración final de microorganismos del orden de 10^6 CFU mL⁻¹. Se procedió entonces a inocular 0.1 mL sobre la superficie de cada placa de agar nutritivo y se distribuyó homogéneamente el inóculo por rayado con un asa de Digralsky. Una vez inoculada cada placa se procedió a depositar sobre la superficie del agar 10 mg de los sólidos [**CS1, CS3, CS6, 16, 17, 18, 19**] y films (**FCS1, FCS3, FCS6, BFCS3** (recortados en forma de cuadrado con dimensiones 15 x 15 mm²)] sobre la superficie inoculada y dejado actuar la inhibición durante 24 h.

Se evaluó cualitativamente la actividad de los films mediante la observación del área de inhibición de crecimiento bacteriano y la actividad antibacteriana de los sólidos mediante la comparación del color inicial del sólido con respecto al adquirido después de 24 h del contacto del sólido con el área de crecimiento bacteriano. Para confirmar que dicho cambio de

coloración se debe a la formación de bacterias sobre el sólido se toman 2 mg aprox. de la muestra sólida y se cultiva en caldo nutritivo. La aparición de turbidez en el mismo después de 24 h indicaría la presencia de bacterias.

8.8.3 *Formación de nanopartículas.*

Las nanopartículas de quitosano fueron obtenidas basadas en la gelación iónica del tripolifosfato de sodio (TPP) con quitosano. Se preparó una solución de 0.1% (m/V) de quitosano CS1 en una solución de 1% CH₃COOH o en una solución 0.1 M NH₄OAc /0.2 M CH₃COOH. Separadamente se preparó otra solución de TPP al 0.1 % disuelto en H₂O previamente filtrada con una membrana de 0.450 µm. La solución de TPP se añadió en alícuotas de 20 µl en agitación moderada (500 rpm) sobre la solución de quitosano a t.a. De tal forma se prepararon una serie de soluciones en que la proporción de quitosano a TPP variaba de 50:1 a 2:1.

Formación de nanopartículas de quitosano a partir de quitosano y TPP.

Medición del tamaño de partícula y el potencial zeta.

La medición del tamaño de partícula y el potencial zeta se realizaron en un equipo Zetasizer Nano ZS Instruments Ltd. (UK) con un capilar de policarbonato DTS 1060 usado a 20 °C. Las mediciones del tamaño de partícula se efectuaron en triplicados usando un factor de atenuación del equipo entre 6 y 8 y las mediciones del potencial zeta se realizaron en triplicados con 10 mediciones entre triplicados.

El tamaño de partícula del quitosano de partida utilizado para la formación de nanopartículas se midió también utilizando el microscopio electrónico de transmisión (TEM), en la que una gota (15 µl) de quitosano se colocó en una

rejilla de cobre recubierta con film de carbono. La rejilla se dejó secar al aire durante varias horas a t.a. El análisis TEM se llevó a cabo con un aparato Hitachi CM 200 a un voltaje de 200 kV.

8.8.4 *Ensayos de formación de geles a partir de reacciones entre GT con AT o GT con quitosano.*

GPTMS, G 3-Glicidiloxipropil trimetoxisilano.

APTMS, A 3-Aminopropil trimetoxisilano.

Se prepararon siete viales (tabla 21) que contenían cada uno 770 μl de la solución de nanopartículas GT, preparadas como se describe en las materias primas, al que se le adicionaban 100 μl de una solución ácida preparado con ácido acético, solución neutra con H_2O , o solución básica con NaOH, y luego 385 μl de la solución de nanopartículas de AT (preparación descrita en materias primas). En el vial 1 se preparó la solución ácida con 10 μl de CH_3COOH y 90 μl de H_2O , en el vial 2 se preparó la solución ácida con 40 μl de CH_3COOH y 60 μl de H_2O . En el vial 3 se preparó la solución ácida con 80 μl de CH_3COOH y 20 μl de H_2O . En vial 4 se preparó la solución neutra con 100 μl de H_2O , en el vial 5 se preparó la solución básica con 10 μl de NaOH y 90 μl de H_2O , en el vial 6 se preparó la solución básica con 40 μl de NaOH y 60 μl de H_2O , y en el vial 7 la solución básica contenía 80 μl de NaOH y 20 μl de H_2O . Se dejó que la solución de AT y GT reaccionaran a distintos pH y se anotó el tiempo de gelificación en minutos.

Formación de geles de Quitosano-nanopartículas GT.

Se prepararon seis disoluciones de quitosano [CS1 ($M_w = 42400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, DD = 87%) y CS3 ($M_w = 86352 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, DD = 86%)] entre 1 al 2 % (m/V) y se tomaron alícuotas de 8 mL de cada uno al cual se adicionaron 750 μl de

la solución de nanopartículas de GT. El pH de la reacción se ajustó entre 5.9 a 6.1 y la temperatura de la reacción se realizó a t.a o a 60⁰ C. El tiempo de gelificación se anotó en horas.