

Saltillo, Coahuila a 15 de octubre de 2020

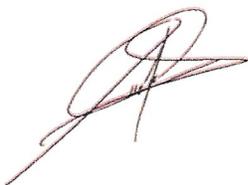
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

Coordinación de Posgrado

Presente

Por este conducto nos permitimos informar a esta coordinación que, el documento de tesis preparado por **LESLIE LARIZA SÁNCHEZ SALAZAR** titulado Modificación y Caracterización de Quitosano con un Tensoactivo del Tipo No-lónico (Brij® 35), el cual fue presentado el día 12 de octubre de 2020, ha sido modificado de acuerdo a las observaciones, comentarios y sugerencias, realizadas por el Comité Evaluador asignado. Por tal motivo, avalamos que el documento adjunto corresponde a la versión final del documento de tesis.

Atentamente,

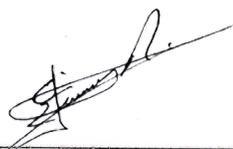


Dr. José Román Torres Lubián
Presidente

Sinodales



Dr. Enrique Saldívar Guerra
Secretario



Dr. Enrique Javier Jiménez Regalado
Vocal

Vo. Bo. de los Asesores



Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz



Dr. René Darío Peralta Rodríguez



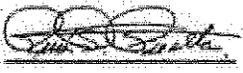
TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

AUTOR: LESLIE LARIZA SÁNCHEZ SALAZAR FIRMA 

TITULO: Modificación y Caracterización de Quitosano con un Tensoactivo del Tipo No-Iónico (Brij® 35).

ASESORES: Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz FIRMA 

Dr. René Darío Peralta Rodríguez FIRMA 

El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 12 de Octubre de 2020



Sello de la Institución

Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández
Director General del CIQA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

**Modificación y Caracterización de Quitosano con un Tensoactivo del
Tipo No-Iónico (Brij® 35)**

Presentada por:

LESLIE LARIZA SÁNCHEZ SALAZAR

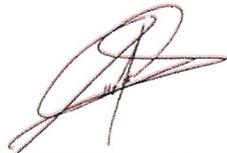
Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

Asesorada por:

Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz
Dr. René Darío Peralta Rodríguez

SINODALES



Dr. José Román Torres Lubián
Presidente



Dr. Enrique Saldívar Guerra
Secretario



Dr. Enrique Javier Jiménez Regalado
Vocal



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

**Modificación y Caracterización de Quitosano con un Tensoactivo del
Tipo No-Iónico (Brij® 35)**

Presentada por:

LESLIE LARIZA SÁNCHEZ SALAZAR

Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

Asesorada por:

Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz
Dr. René Darío Peralta Rodríguez

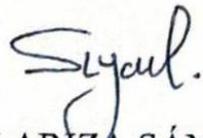
Saltillo, Coahuila

Octubre, 2020

DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 12 de octubre de 2020



LESLIE LARIZA SÁNCHEZ SALAZAR

Nombre y Firma

Agradecimientos

A mis asesores el Dr. Héctor Iván Meléndez y el Dr. René Peralta, por brindarme su confianza y conocimiento a lo largo del desarrollo de la tesis.

A CONACYT por la beca de maestría, así como al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) por ofrecerme la oportunidad de continuar con mi formación profesional y al Laboratorio Nacional de Micro y Nanofluídica, Subsede CIQA (Proyecto 299058, 2019) por su apoyo para el desarrollo experimental de esta investigación.

Agradezco a los académicos del CIQA por compartir su conocimiento y por brindarme las bases necesarias para concluir con mi maestría, así como a los técnicos y compañeros por su disposición, consejo y hospitalidad. Agradezco también al departamento G por ayudarme y permitirme utilizar las instalaciones para realizar las caracterizaciones pertinentes, a la técnico Gladis Cortez por su ayuda continua en el laboratorio, a Bertha Puente por los estudios realizados por XRD y a Alfonso Mercado por los estudios de TGA.

Agradezco a mis sinodales por la evaluación del presente trabajo y por sus recomendaciones, especialmente agradezco al Dr. Román Torres por su guía y soporte técnico y al Dr. Enrique Saldívar por su confianza y apoyo.

A todos los amigos que hice durante la maestría por hacer de esta etapa de mi vida más sencilla e inolvidable.

Y sobre todas las cosas agradezco a mi familia: A mi madre por confiar ciegamente en mí y animarme siempre a llegar más lejos, a mi padre por sus consejos, a mis suegros por el apoyo incondicional y a mi novio y compañero de vida por estar en mis desvelos y en mis triunfos, por tranquilizar mis momentos de inseguridad e impulsarme a lograr mis metas.

A todos ellos, muchas gracias.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	7
II. ANTECEDENTES	8
2.1 Microemulsiones	8
2.1.1 Tipos de microemulsiones	9
2.1.2 Microemulsiones como sistemas de liberación de fármacos	10
2.2 Quitosano (CS)	11
2.2.1 Estructura y propiedades fisicoquímicas	12
2.2.2 Grado de deacetilación	14
2.2.3 Aplicaciones en sistemas de liberación de fármacos	15
2.2.4 Modificación de CS	17
2.2.5 Rutas de modificación	18
2.2.6 Sistemas formados a partir de CS modificado	23
III. HIPÓTESIS	26
IV. OBJETIVO GENERAL	26
4.1 Objetivos Específicos	26
V. DESARROLLO EXPERIMENTAL	27
5.1 Funcionalización de Brij 35 con SA (Brij-SA)	28
5.2 Injerto de Brij-SA en CS	28
5.3 Determinación de la CMC del BCS	30
5.4 Técnicas de caracterización	30
5.4.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)	30
5.4.2 Resonancia Magnética Nuclear de protón (¹ H RMN)	31
5.4.3 Difracción de rayos X	31
5.4.4 Análisis Termogravimétrico	32
5.5 Concentración Micelar Crítica	32
VI. RESULTADOS	33
6.1 Caracterización del CS	33
6.1.1 Caracterización del CS mediante FT- IR	33
6.1.2 Caracterización del CS mediante RMN de protón	34
6.1.3 Determinación del DD del CS	35
6.2 Funcionalización del Brij con SA	37
6.2.1 Caracterización del Brij-SA mediante FT- IR	37

6.2.2 Caracterización del Brij-SA mediante RMN (^1H).....	38
6.3 Modificación del CS con Brij-SA	40
6.3.1 Caracterización mediante FT-IR del CS modificado (BCS)	40
6.3.2 Caracterización del CS modificado por RMN (^1H)	41
6.3 Difracción de rayos X (XDR)	44
6.4 Análisis Termogravimétrico (TGA)	45
6.5 Concentración Micelar Crítica (CMC).....	48
6.7 Pruebas preliminares de formación de microemulsiones empleando BCS	51
VII.CONCLUSIONES.....	51
TRABAJO A FUTURO.....	52
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquematación de una micela.....	10
Figura 2. Deacetilación de la quitina.	11
Figura 3. Estructura química del quitosano (CS).....	13
Figura 4. Producción de derivados de CS por N-acilación. ³⁵	19
Figura 5. Síntesis de N,N,N trimetil-quitosano. ⁴⁰	20
Figura 6. Estructura química del CS modificado con diferentes grupos sulfato. (I) 6-O- CS sulfatado (C-6); (II) 3-O CS sulfatado (C-3); (III) 2-N- CS sulfatado (C-2) y (IV) 2-N, 6-O CS sulfatado (C-2 y C-6). ⁴¹	21
Figura 7. Reacción de entrecruzamiento entre CS y glutaraldehído (GTA). ⁴²	22
Figura 8. Esquema de la síntesis del CS injertado con poliacrilamida. ⁴³	23
Figura 9. Esquematación del desarrollo experimental.	27
Figura 10. Esquema de funcionalización del Brij 35 con Anhídrido succínico (SA).	28
Figura 11. Esquema de la modificación del CS mediante el injerto de Brij-SA	29
Figura 12. Espectro de FT-IR del CS (Nicolet Magna– IR TM Spectrometer 550 modo ATR).....	33
Figura 13. Espectro de 1H RMN del CS (Bruker Avance III 500 MHz, D ₂ O:HCl 98:2 v/v) 34	
Figura 14. Espectro FT-IR de SA, Brij 35 y Brij-SA CS (Nicolet Magna– IR TM Spectrometer 550 modo ATR).	38
Figura 15. Espectro RMN (1H) del Brij 35, Brij-SA (Bruker Avance III 500 MHz, CDCl ₃). 39	
Figura 16. Espectros de FT-IR de CS y BCS sintetizados con diferente proporción en relación molar de Brij-SA:CS CS (Nicolet Magna– IR TM Spectrometer 550 modo ATR). 41	
Figura 17. Espectros de RMN de protón para muestras de BCS obtenidos con diferente composición en relación molar de Brij-SA:CS (Bruker Avance III 500 MHz, D ₂ O:HCl 98:2 v/v)).	42
Figura 18. Difractogramas de Brij 35, CS y BCS obtenidos con diferente relación molar de Brij-SA:CS.	45
Figura 19. Curvas de TGA del CS y Brij 35.....	46
Figura 20. Termogramas de BCS sintetizados con diferente relación molar de Brij-SA:CS (1:7,1:14, 1:29, 1:60).....	47
Figura 21. Estudio de la estabilidad térmica del CS en función de la relación molar Brij-SA:CS.....	48

Figura 22. Curvas de (a) tensión superficial, (b) densidad, (c) conductividad eléctrica y (d) pH medidas a diferentes concentraciones de la muestra BCS (1:7)..... 49

Figura 23. Representación esquemática de la estrategia planteada para la formación. ... 53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición, relación molar y relación peso de las muestras de CS modificado.	30
Tabla 2. Desplazamiento químico y porcentaje de deacetilación del CS.....	36
Tabla 3. Señales observadas en RMN y sus respectivos grupos funcionales para Brij35 y Brij 35 modificado con SA.....	39
Tabla 4. Señales observadas en RMN y sus respectivos grupos funcionales del CS antes y después de ser modificado.	42
Tabla 5. Porcentaje de injerto de Brij-SA en BCS obtenidos a diferente relación en peso de Brij-SA:CS.....	43
Tabla 6. CMC y forma micelar de diferentes sistemas basados en CS modificado.	50

I. INTRODUCCIÓN

En años recientes, los polímeros se han convertido en los materiales más utilizados y estudiados ya que presentan una amplia gama de propiedades fisicoquímicas que pueden ser utilizadas en un gran número de aplicaciones en diferentes sectores tanto industriales como en investigación. El quitosano (CS) es un polímero natural perteneciente a la familia de los polisacáridos y es uno de los polímeros que ha recibido mayor atención debido a su fácil obtención, sus características estructurales y sus propiedades únicas. A diferencia de la mayoría de los polímeros sintéticos, el CS es biocompatible, biodegradable y no es tóxico. Por lo anterior, este biopolímero puede ser utilizado en diversas aplicaciones en el campo biológico y farmacéutico en particular.

Sin embargo, las aplicaciones en las que puede ser utilizado el CS se ven limitadas por su falta de solubilidad en medios acuosos, medios orgánicos y en la mayoría de los disolventes comunes. Esto se debe al alto peso molecular y a los puentes de hidrógeno presentes en su estructura química. El CS posee una estructura con amplias posibilidades de funcionalización, por lo que, es viable llevar a cabo su modificación con la finalidad de mejorar su solubilidad y alterar sus propiedades fisicoquímicas facilitando su uso como material biológico.

Una de las aplicaciones de mayor interés en el sector médico es el tratamiento de enfermedades, como el cáncer, mediante el uso de sistemas de liberación de fármacos. En la actualidad, los sistemas de administración de fármacos convencionales presentan distintas dificultades para el tratamiento efectivo de dichas enfermedades. En este sentido, las microemulsiones (sistemas estables compuestos por la mezcla de aceite, agua y uno o más agentes anfifílicos) son de gran interés por sus propiedades únicas como su estabilidad termodinámica, y su capacidad de funcionar como sistemas acarreadores de fármacos, ya que pueden ser cargadas con una gran variedad de agentes activos, tanto hidrofóbicos como hidrofílicos.

La biodisponibilidad, grado y rapidez con que una forma activa (fármaco o uno de sus metabolitos) accede a la circulación y alcanza su lugar de acción, de un agente activo puede ser potencializada al utilizar un polímero, como el CS, para recubrir las gotas de la microemulsión en las cuales se encuentra el agente activo. De esta manera se puede crear un sistema que libere de forma controlada y específica el fármaco aumentando su biodisponibilidad y disminuyendo los efectos secundarios durante el tratamiento. En la presente investigación se llevó a cabo la modificación de CS con un tensoactivo de tipo no iónico (Brij 35) para su futuro uso en la preparación de microemulsiones.

El CS así como los materiales obtenidos, se caracterizaron mediante diferentes técnicas como difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear, espectroscopia infrarroja, análisis termogravimétrico, entre otras.

II. ANTECEDENTES

En el siguiente apartado se abordarán tópicos relacionados con el CS, su estructura y propiedades fisicoquímicas, así como la modificación de este para su posterior uso en el campo farmacéutico.

También, se abordarán temas específicos relacionados con el uso y la formación de microemulsiones preparadas a partir de CS modificado para ser utilizadas como sistemas de liberación de fármacos.

2.1 Microemulsiones

Una microemulsión es un sistema termodinámicamente estable el cual se encuentra formado por dos fases inmiscibles (fase oleosa y fase acuosa) en presencia de al menos un agente emulsificante (tensoactivo; a veces acompañado de un cotensoactivo). Las microemulsiones se observan a simple vista como un sistema homogéneo isotrópico con baja viscosidad y alta transparencia. La fase dispersa en una microemulsión son partículas o gotas muy pequeñas de entre 5 - 100 nm; debido a que el tamaño es más pequeño que la longitud de onda visible, la solución se observa transparente. Las microemulsiones son formadas fácilmente de forma

espontánea y no requieren de mucha energía para ello, sólo la suficiente para mezclar los componentes.¹²

Las microemulsiones son de gran interés en el área farmacéutica ya que poseen muchas ventajas, como su fácil preparación, estabilidad y su capacidad de ser cargadas con agentes activos.³⁻⁵ Debido a sus propiedades particulares, este tipo de sistemas pueden ser utilizados como vehículo para la liberación de fármacos, por lo que es de gran importancia estudiar sus propiedades a fondo.

2.1.1 Tipos de microemulsiones

Existen tres tipos de microemulsiones.

1. Aceite en agua (o/w). Las gotas de aceite se encuentran dispersas en la fase acuosa continua.
2. Agua en aceite (w/o). Las gotas de agua se encuentran dispersas en la fase oleosa continua.
3. Bicontinua. En donde la fase acuosa y la fase aceitosa son continuas.

En el primer caso (o/w), la concentración de aceite es baja (fase dispersa), contrariamente en las microemulsiones w/o la fracción en volumen del agua es baja. La tercera clasificación se define para sistemas en los que el aceite y el agua existen como una fase continua en presencia de una interface estabilizada por un tensoactivo.⁶

La formación de micelas depende de las propiedades del aceite y del surfactante, de la proporción aceite-agua y de la temperatura. Las micelas son agregados de tensoactivo en un medio líquido las cuales son formadas cuando la concentración del tensoactivo excede la concentración micelar crítica (CMC): concentración de tensoactivo necesaria para formar micelas. En micelas normales los grupos hidrofílicos (cabezas polares) forman una coraza externa en contacto con el agua, mientras que las cadenas hidrocarbonadas hidrofóbicas (colas no polares) son dirigidas hacia el interior de la micela. Para la formación de microemulsiones, generalmente las micelas son hinchadas con aceite/agua en su interior formando agregados más grandes y la presencia del tensoactivo en la capa externa permite

la estabilización del sistema debido a la reducción de la tensión interfacial entre las dos fases. ^{1,6} La Fig.1 muestra un esquema de una micela normal (o/w).

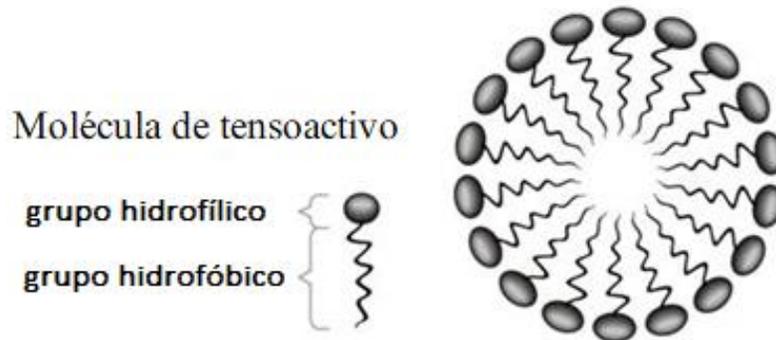


Figura 1. Esquemización de una micela

Las micelas son ampliamente utilizadas en el campo biológico por su habilidad de disolver y transportar sustancias no polares a través de un medio acuoso o por su capacidad de encapsular fármacos poco solubles en agua.

2.1.2 Microemulsiones como sistemas de liberación de fármacos

Las microemulsiones tienen distintas propiedades que son de gran interés para su uso como sistema de liberación de fármacos, algunas de ellas son su estabilidad termodinámica, su claridad óptica y su fácil preparación; adicionalmente, el uso de microemulsiones mejora la eficiencia terapéutica del fármaco y permite la reducción del volumen del vehículo de administración, en consecuencia, se minimizan los efectos secundarios tóxicos. ^{2,3,7}

Las microemulsiones son dispersiones homogéneas de una sola macrofase, pero con diferente polaridad. Esta diferencia en la polaridad permite la solubilización de materiales tanto solubles en agua como en aceite. Además, también es posible incorporar fármacos anfílicos dentro de las microemulsiones. En microemulsiones del tipo w/o el fármaco hidrofílico puede ser incorporado en las gotas de la fase acuosa, mientras que en las microemulsiones o/w, los fármacos deben ser de carácter lipofílico para ser incorporados en la fase apolar oleosa. ⁸⁻¹⁰

Los sistemas formulados a partir de microemulsiones para ser utilizados como acarreadores de fármacos pueden administrarse por diferentes rutas entre las

cuales se encuentra la dérmica, nasal, oral, ocular, parenteral, entre otras. Cada una de estas rutas posee ventajas específicas.

La ruta oral es la forma más común de administración de medicamentos, sin embargo, más de 40 % de los nuevos agentes bioactivos utilizados en farmacia poseen baja solubilidad en agua lo cual resulta en una dosificación oral insatisfactoria. El uso de microemulsiones puede mejorar significativamente la biodisponibilidad oral de los fármacos hidrofóbicos.¹¹⁻¹³ Generalmente, la fórmula es administrada en forma de una cápsula suave conteniendo una solución oleosa de la droga y el surfactante.

2.2 Quitosano (CS).

El CS es un polímero natural perteneciente a la familia de los polisacáridos y es después de la celulosa, el polímero más abundante en la naturaleza y puede ser encontrado en el exoesqueleto de crustáceos. Además, es un polímero catiónico, lineal y biodegradable y es obtenido mediante la deacetilación de la quitina (Fig.2).

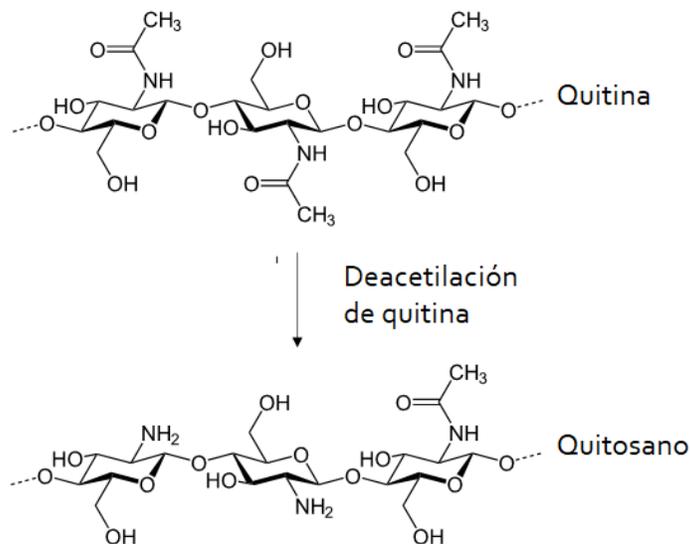


Figura 2. Deacetilación de la quitina.

Este polímero fue descubierto por Rouget en 1859, quien logró obtener un producto soluble en ácidos orgánicos al someter la quitina en una solución hirviendo de hidróxido de potasio. Rouget fue el primero en describir el proceso de deacetilación de la quitina, a este proceso lo llamó “quitina modificada”. En 1894 Hoppe-Seyler le

dio por primera vez el nombre de “quitosano”.¹⁴ Es también llamado por algunos autores por el término “aminosacárido” debido a su estructura química.

A pesar de que la quitina es encontrada naturalmente en grandes cantidades en un vasto número de fuentes, el CS es únicamente encontrado naturalmente en cantidades limitadas. Es utilizado de forma industrial o en investigación; es típicamente obtenido mediante la deacetilación de la quitina utilizando distintos tratamientos químicos.

En la industria, es mayormente extraído de caparzones de cangrejos, camarones y crustáceos mediante tratamientos ácidos, este tipo de tratamientos son dañinos para el medio ambiente y no son sustentables.¹⁵ En investigación, el CS es sintetizado mediante la deacetilación de la quitina. Este proceso usualmente implica remover los grupos acetilo de la cadena molecular de la quitina utilizando un tratamiento de NaOH concentrado en un periodo de tiempo prolongado, de esta forma los grupos acetilo son sustituidos por grupos amino. La deacetilación de la quitina normalmente se lleva a cabo en una atmósfera inerte para evitar reacciones alternas como la despolimerización o la generación de especies reactivas.¹⁶ Es importante recalcar que la proporción de unidades monosacáridas del CS dependen en gran medida del tratamiento alcalino durante la modificación de la quitina.

Este biopolímero, así como sus derivados, presenta un gran potencial de aplicaciones biotecnológicas, debido a su origen natural y su elevada disponibilidad.

2.2.1 Estructura y propiedades fisicoquímicas

El CS (Fig.3) es un copolímero constituido por unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa y 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranososa unidas mediante enlaces glicosídicos $\beta(1-4)$, y puede presentar diferentes proporciones de N-acetilglucosamina.^{17,18}

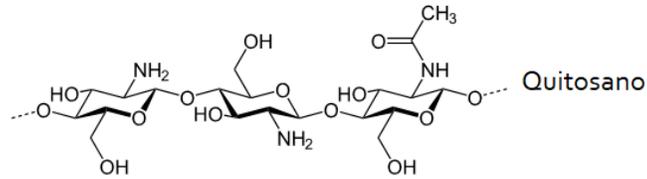


Figura 3. Estructura química del quitosano (CS)

Usualmente tiene un grado de deacetilación (DD por “deacetylation degree”) mayor al 50 % y su peso molecular se encuentra entre los 300 y 1000 kDa dependiendo de la fuente de obtención de la quitina.

Debido a su estructura única, posee una gran variedad de propiedades las cuales lo hacen de interés en el campo biomédico. Las propiedades fisicoquímicas del CS dependen principalmente del peso molecular y de la cantidad de grupos reactivos presentes en su estructura, es decir, su grado de deacetilación.

Un ejemplo claro de esto es la diferencia que existe entre el CS y la quitina, es decir, la presencia de grupos amino libres: en el CS permite que este sea soluble en medios ácidos diluidos (pH <6) lo cual facilita su procesabilidad en condiciones leves de acidez.

Este polímero tiene tres tipos de grupos funcionales reactivos, un grupo amino/acetamido, así como, dos grupos hidroxilo primario y secundario (C-2,C-3 y C-6).¹⁹ Los grupos amino son los principales responsables de las propiedades fisicoquímicas y su disposición regular permite la formación de puentes de hidrógeno lo cual le confiere una estructura rígida y buena estabilidad térmica (temperatura de descomposición alrededor de 170 °C).¹⁴ Además, los grupos amino pueden ser protonados por ciertos ácidos otorgándole una carga positiva lo cual le confiere un comportamiento de policación que permite explicar algunas de sus propiedades como por ejemplo su habilidad de enlazarse con sustancias cargadas negativamente como lípidos, proteínas, colorantes, así como, su comportamiento como adherente y absorbente.²⁰ Adicionalmente, los grupos aminos también han sido correlacionados con las funciones floculantes y biológicas que presenta el CS.

La distribución aleatoria de los grupos aminos libres a lo largo de la cadena puede influir en la solubilidad del polímero y en el carácter hidrófobo del grupo acetilo.

Otro factor importante que debe ser considerado es el peso molecular y su distribución. El CS con alto peso molecular (HMWC) forma soluciones con viscosidades altas y es soluble en condiciones ácidas e insoluble a valores de pH por encima de 6.3 mientras que el oligómero de CS forma una solución con baja viscosidad y es soluble en pH neutro. A diferencia de muchos polisacáridos, el CS de bajo peso molecular (LMWC) posee carga positiva lo cual le permite formar enlaces fuertes en superficies cargadas negativamente, esta propiedad es responsable en gran parte de la actividad biológica observada en este polímero.¹⁹

2.2.2 Grado de deacetilación.

Se denomina grado de deacetilación al porcentaje de grupos amino libres presentes en la cadena del quitosano después del proceso de deacetilación de la quitina, es decir, el DD representa la proporción de unidades de N-acetil-D-glucosamina con respecto al número total de unidades del polímero y se puede considerar como una medida de la pureza del material.²⁰⁻²³

La quitina parcialmente deacetilada puede encontrarse en la naturaleza, pero únicamente se considera quitosano cuando el DD es igual o superior a 50 %. Usualmente el grado de deacetilación se encuentra entre 50 – 98 % pero esto depende del método de preparación, el método de deacetilación utilizado y de la fuente de obtención de la quitina.^{15,21,22}

La importancia del DD radica en su estrecha relación con las propiedades fisicoquímicas del CS, un ejemplo de esto es la solubilidad. La solución acuosa de CS usualmente presenta una alta viscosidad incluso en concentraciones pequeñas. Un CS con DD entre 55-70 % es definido como CS con bajo grado de deacetilación y es casi completamente insoluble en agua. Un DD entre 70-85 % es un CS con un grado de deacetilación medio y es parcialmente soluble en agua. Finalmente, un DD entre 85-95 % se refiere a un CS con alto grado de deacetilación y posee una buena solubilidad en agua.²³

Por otro lado, existen estudios que han demostrado que para lograr una mejor actividad biológica, el DD debe permanecer alrededor de 40 %.²⁰ Además, el DD afecta la flexibilidad de las moléculas del CS lo cual influye en los distintos arreglos de la molécula afectando sus propiedades biológicas y fisicoquímicas. Algunas de las propiedades que dependen del DD son la biocompatibilidad, biodegradabilidad, actividad antibacterial, antifúngica, su toxicidad, entre otras.²⁴

En un estudio Trung y col. obtuvieron CS con diferente grado de deacetilación (75, 87 y 96 %) para la fabricación de membranas en donde se probó la absorción de agua, de grasas y de colorante naranja. Del estudio anterior encontraron que el CS con DD de 75 % mostró mayor capacidad de absorción de agua debido a su más bajo nivel de cristalinidad mientras que las membranas con DD de 87 y 96 % mostraron mayor capacidad de absorción debido a la mayor cantidad de grupos amino presentes en su estructura.²⁵

2.2.3 Aplicaciones en sistemas de liberación de fármacos

El CS al ser un material natural de gran abundancia aprobado por la FDA y ampliamente utilizado en aplicaciones cosméticas, biomédicas y farmacéuticas, ha atraído la atención del científico farmacéutico para su uso en sistemas de administración de fármacos.

Las aplicaciones en las que se utiliza este polímero se pueden clasificar dependiendo de la forma del material polimérico y la manera de dosificación del fármaco. Comúnmente, se utiliza en forma de micro o nanocápsulas, nanopartículas, hidrogeles, fibras y nanofibras, en forma de tabletas, películas, en solución líquida, entre otras.^{19,26,27}

Las nanopartículas son una de las formas más populares ya que pueden ser utilizadas como sistemas acarreadores de fármacos, en donde el ingrediente activo es disuelto, encapsulado, adsorbido o químicamente unido a un material que funciona como medio de transporte. Este tipo de partículas son ideales para el tratamiento de enfermedades ya que permiten la combinación de dos factores importantes: la administración del fármaco en una zona específica y la obtención de perfiles de liberación de fármacos óptimos.¹⁸ En las últimas dos décadas, el CS ha

sido extensamente utilizado para la fabricación de nanopartículas debido a sus propiedades únicas. El principal uso que se le ha dado a las nanopartículas es como liberador de agentes antibacteriales, antivirales, antifúngicos y parasiticida. Los agentes farmacéuticos más estudiados como sistemas de liberación en nanopartículas son los anticancerígenos, un ejemplo es la doxorubicina (DOX). Mitra y col. sintetizaron nanopartículas de CS para la encapsulación de dextrano con DOX para el tratamiento de tumores cancerígenos. Como resultado obtuvieron una mejora en la eficiencia terapéutica favorecida por la presencia de CS.²⁸

Algunos usos alternativos de las nanopartículas fueron demostrados por Othman y col. quienes sintetizaron nanopartículas de CS conteniendo ácido ascórbico (LAA) y timoquinona (TQ) mediante gelación iónica. Estos autores encontraron que las nanopartículas sintetizadas pueden funcionar como sistemas acarreadores efectivos cuando se requiere transportar más de un fármaco.²¹

Otra de las formas más novedosas es el uso de fibras o nanofibras de CS como sistemas acarreadores de agentes activos (antibióticos, ácidos nucleicos, proteínas). El CS posee propiedades bactericidas y hemostáticas, las cuales permiten sanar heridas de forma eficiente. Debido a esto, las fibras de este polímero han sido consideradas para ser utilizadas como material de vendaje para heridas. Wang y col. desarrollaron fibras de CS con ácido salicílico para ser utilizadas como base de incorporación de fármacos.²⁹ Mediante este método, encontraron que el uso de fibras cargadas con medicamentos permite de forma exitosa la liberación de fármacos en zonas localizadas. De igual manera, Celik y col. prepararon fibras de CS cargadas con ibuprofeno. El estudio *in vivo* confirmó que 70 % del fármaco fue liberado de la matriz en un tiempo de 460 minutos. Además, este método permite la liberación del fármaco de forma controlada y sostenida.³⁰

El uso de sistemas de liberación de fármacos basados en micro y nanoesferas permite incrementar la duración de su vida útil, controlar la velocidad de liberación y administrar los agentes activos en zonas específicas. Existen muchos métodos utilizados para la formación de las nano y micro esferas incluyendo evaporación de disolventes, gelación iónica, secado por aspersion y sistemas de emulsión,

microemulsión y nanoemulsión, entre otros. En los sistemas de liberación de fármacos basados en la formulación de microemulsiones, el CS puede ser utilizado para recubrir las gotas de microemulsión conteniendo el principio activo y mejorar su biodisponibilidad. Este polímero posee múltiples ventajas como material de recubrimiento, por ejemplo, tiene la capacidad de controlar la liberación de fármacos por periodos prolongados de tiempo, puede mejorar la carga útil del fármaco y tiene mejores propiedades bioadhesivas en comparación con las partículas no recubiertas.

A pesar de todas las propiedades atractivas, el uso del CS se ve limitado por sus pobres propiedades mecánicas y su baja solubilidad tanto en soluciones biológicas como en disolventes orgánicos. Para mejorar la interacción entre el CS y las estructuras bio-relevantes, éste puede ser modificado aumentando su hidrofobicidad para conferirle un carácter anfifílico. El CS anfifílico puede ser utilizado para la formación de sistemas nanoestructurados autoensamblables óptimos para aplicaciones biomédicas.

2.2.4 Modificación de CS

Las propiedades únicas del CS dependen de su composición química y estructural. El CS tiene en su estructura entre 7-9.5 % de nitrógeno, cuenta con grupos amino e hidroxilo que le confieren la capacidad de ser hidrofílico y la propiedad de ser policatiónico. Además, es un polímero altamente cristalino, con fuertes interacciones intermoleculares, alto peso molecular y alta viscosidad, debido a esto, posee una baja solubilidad en soluciones neutras/alcalinas y en disolventes orgánicos lo cual restringe su uso en aplicaciones biomédicas.

Por todo lo anterior, se han estudiado distintos métodos de modificación del CS para mejorar su solubilidad. Afortunadamente, su estructura principal posee grupos aminos e hidroxilos los cuales pueden ser modificados o injertados con diferentes moléculas para conferirle propiedades específicas.³¹ Una forma de alterar sus propiedades fisicoquímicas es introduciendo ciertas estructuras a la cadena polimérica. Por ejemplo, puede convertirse a soluble en agua al introducir grupos funcionales ácidos mediante la modificación con ácido lactobiónico. Otra forma de

modificación química es por medio de la unión covalente de biomoléculas específicas como oligopéptidos o proteínas. Algunos oligopéptidos de interés pueden ser directamente unidos al CS por medio de reacciones entre los grupos carboxilos de los péptidos y los grupos amino del CS formando puentes imida.³²

Otra forma de derivación es mediante la modificación hidrofóbica de la cadena hidrofílica del CS que da como resultado derivados de este polímero con carácter anfifílico. El CS con carácter anfifílico adquiere la capacidad de formar estructuras autoensamblables y mejora su interacción con agentes biorrelevantes. Este tipo de modificación puede ser utilizada ampliamente en aplicaciones biomédicas.

2.2.5 Rutas de modificación

El CS y sus derivados se han convertido en un tema de gran interés especialmente en el área de los alimentos, cosméticos, ambiental y en el sector farmacéutico y biomédico. Es importante mencionar que las propiedades de mayor interés han sido posibles mediante la modificación de este polímero.

Un gran número de aplicaciones se han obtenido mediante la modificación de CS utilizando la reactividad de sus grupos amino e hidroxilo. Debido a las limitantes propias de su naturaleza, se ha incrementado el interés en el desarrollo de estrategias para modificar la estructura química de este biopolímero con el objetivo de mejorar su solubilidad y sus propiedades biológicas. A continuación, se describen algunas de las rutas de modificación del CS de mayor interés.

Acetilación

La N-acilación es el método de modificación de CS más estudiado. Este método le confiere propiedades hidrófobas al injertar diferentes ácidos grasos en su estructura. La modificación de los grupos amino e hidroxilo del CS mejora su solubilidad en medios tanto ácidos como alcalinos, así como su biodegradabilidad y biocompatibilidad y reduce su toxicidad. Este método de modificación mejora sustancialmente su eficiencia en aplicaciones biomédicas.³³

La reacción de acilación se lleva a cabo entre el CS y anhídridos de ácido o haluros de acilo (Fig.4). La reacción toma lugar en los grupos amino e hidroxilo del CS.

Cuando la acilación se lleva a cabo en el grupo amino, se le llama *N*-acilación y cuando la sustitución sucede en el grupo hidroxilo se conoce como *O*-acilación. El proceso se realiza en presencia de ácido acético/metanol, metanol/etanol, piridina, dicloroetano/ácido tricloroacético o formaldehído/metanol.³⁴

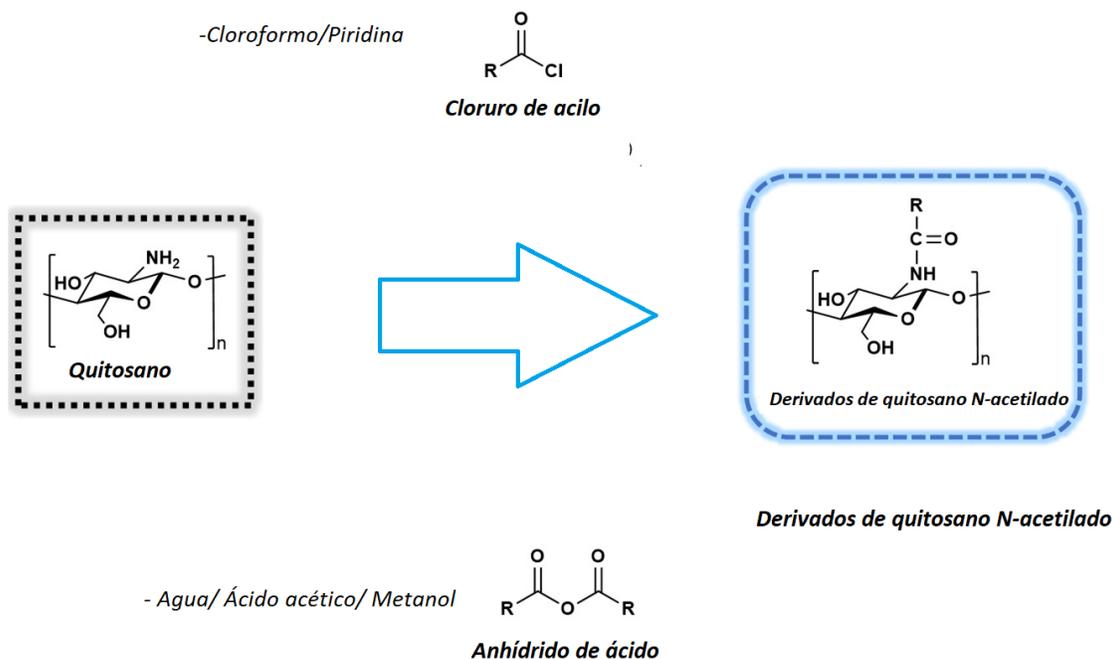


Figura 4. Producción de derivados de CS por *N*-acilación.³⁵

Carboxiacilación

El *N*-succinil quitosano se prepara mediante la formación del carboxiacilo al introducir anhídridos cíclicos al CS. Entre estos anhídridos, la reacción del anhídrido succínico con el CS en medios de dimetilsulfóxido o ácido acético/metanol se produce el *N*-succinil quitosano (NSC) con un grado específico de succinilación. El NSC posee una excelente solubilidad con pH < 4.5 y >7. Su solubilidad en ambientes ácidos se debe a la protonación de los grupos amino, mientras que en medios básicos se debe a la formación de iones carboxilatos (-COO). Sin embargo, es insoluble en pH entre 4.5 y 6.8.³⁶

Por otro lado, el *O*-succinil quitosano posee propiedades similares al NCS y su proceso de formación es menos común. Zhang y col., establecieron un proceso de

preparación de O-succinil quitosano soluble en agua. El proceso involucra la protección de los grupos aminos con grupos ftaloilo en dimetil formamida. Posteriormente, se introducen grupos succínicos seguido de la eliminación de los grupos ftaloilo.³⁷

Cuaternización

Muchos autores han demostrado la posibilidad de modificar la carga positiva (NH_3^+) del CS para hacerlo soluble en un mayor intervalo de valores de pH así como en medios neutros y ligeramente alcalinos. La cuaternización es uno de los métodos utilizados para mejorar la solubilidad del CS en agua. El CS comúnmente se mantiene cargado positivamente a $\text{pH} < 6.5$, mientras que el CS cuaternizado permanece positivo en pH por encima de 6.5.³³

El CS cuaternizado es ampliamente investigado por sus propiedades biológicas y por sus posibles aplicaciones biomédicas y en liberación de fármacos.³⁸ El N,N,N-trimetil CS (TMC) es el CS cuaternizado más estudiado. El TMC es obtenido por dos reacciones consecutivas (Fig. 5), la primera se lleva a cabo entre el yoduro de metilo (CH_3I) y el CS en presencia de N-metil-2-pirrolidona (NMP) y la segunda sucede al cambiar iones de yoduro por iones de cloruro utilizando una resina de intercambio iónico.³⁹ Se pueden obtener varios tipos de CS cuaternizado modificando el largo de la cadena haluros de alquilo.

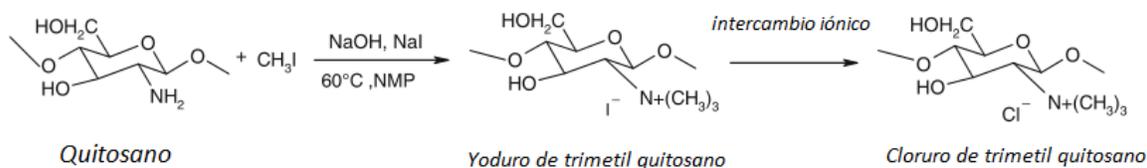


Figura 5. Síntesis de N,N,N trimetil-quitosano.⁴⁰

Sulfatación

La sulfatación del CS y derivados genera importantes propiedades biológicas las cuales han sido aplicadas en diferentes áreas desde adsorción de iones metálicos

hasta sistemas de liberación de fármacos. La sulfatación de CS se prepara utilizando diferentes reactivos incluyendo el ácido clorosulfónico (HSO_3Cl), ácido sulfúrico, SO_3 o ácido sulfámico (Fig. 6).⁴⁰ Desafortunadamente, la sulfatación del CS carece de estudios exhaustivos y se ha encontrado que la sulfatación afecta la posición y el grado de sustitución por lo que normalmente se obtienen diferentes patrones con la misma metodología.³³

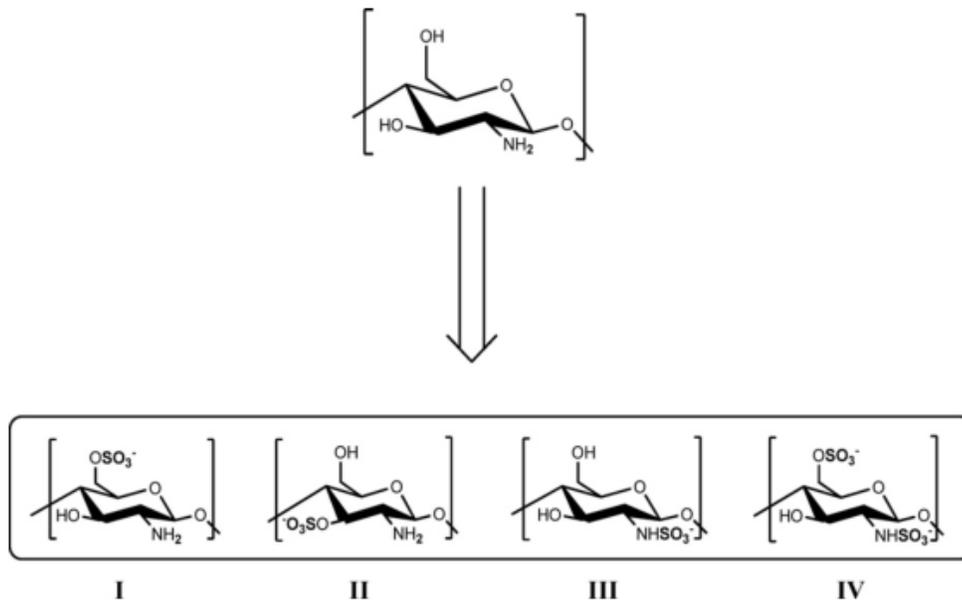


Figura 6. Estructura química del CS modificado con diferentes grupos sulfato. (I) 6-O- CS sulfatado (C-6); (II) 3-O CS sulfatado (C-3); (III) 2-N- CS sulfatado (C-2) y (IV) 2-N, 6-O CS sulfatado (C-2 y C-6).⁴¹

Entrecruzado

Otro método de modificación de CS es mediante el entrecruzamiento. La preparación de CS entrecruzado requiere el uso de agentes químicos específicos para ligar las cadenas y crear una red macromolecular tridimensional. El CS normalmente se entrecruza mediante enlaces covalentes en presencia de derivados de aldehídos en medios ácidos o básicos.²⁶ El glutaraldehído (GTA) es el agente de entrecruzamiento más utilizado en este método. El proceso se lleva a cabo mediante

una reacción de condensación entre el aldehído y la amina primaria del CS en presencia de hidrógeno (Fig.7).^{41,42}

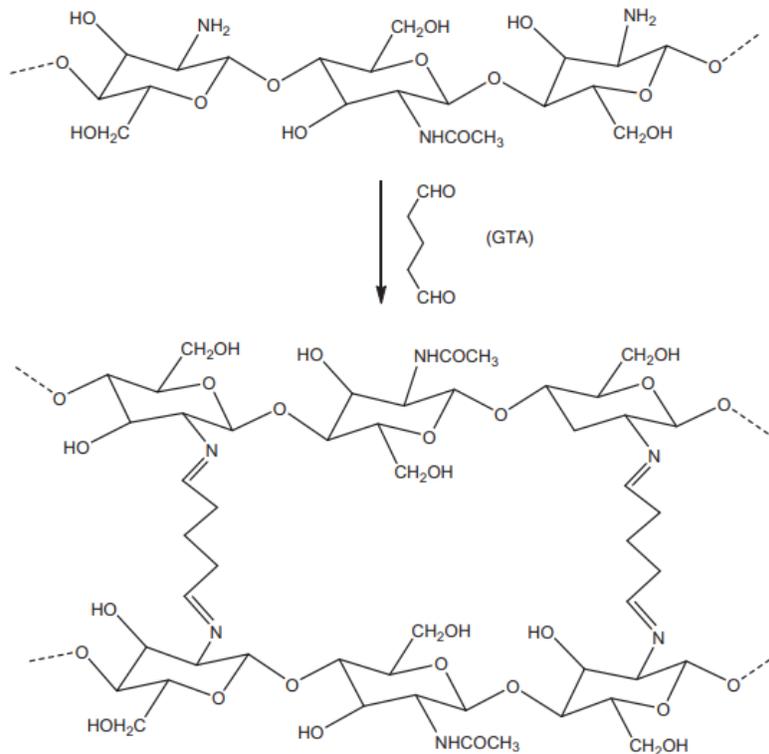


Figura 7. Reacción de entrecruzamiento entre CS y glutaraldehído (GTA).⁴²

Injerto

Otra forma de modificar CS es mediante la formación de derivados funcionales al injertar una molécula en el esqueleto del CS por medio de enlaces covalentes. El CS posee dos grupos reactivos en los cuales se puede hacer el injerto. Los grupos amino libres de las unidades deacetiladas y en el grupo hidroxilo en el carbono C3 y C6 de la unidad acetilada y deacetilada.⁴¹ El injerto del CS permite mejorar de forma considerable algunas de sus propiedades como la solubilidad y la actividad antibacteriana. Molatlhegi y col. describieron la síntesis del CS injertado con poliácridamida y su uso como floculante y absorbente en caolín. En este caso, el CS es tratado con el iniciador químico nitrato de amonio cérico ((NH₄)₂Ce(NO₃)₆) el cual abstrae un hidrógeno del grupo amino del CS, generando un radical libre el cual reacciona con el doble enlace de la acrilamida logrando de esta manera su injerto en el CS (Fig. 8). El trabajo anterior mostró una mejora considerable de las

propiedades absorbentes y floculantes del CS injertado con poliacrilamida en comparación con el CS original.^{43,44}

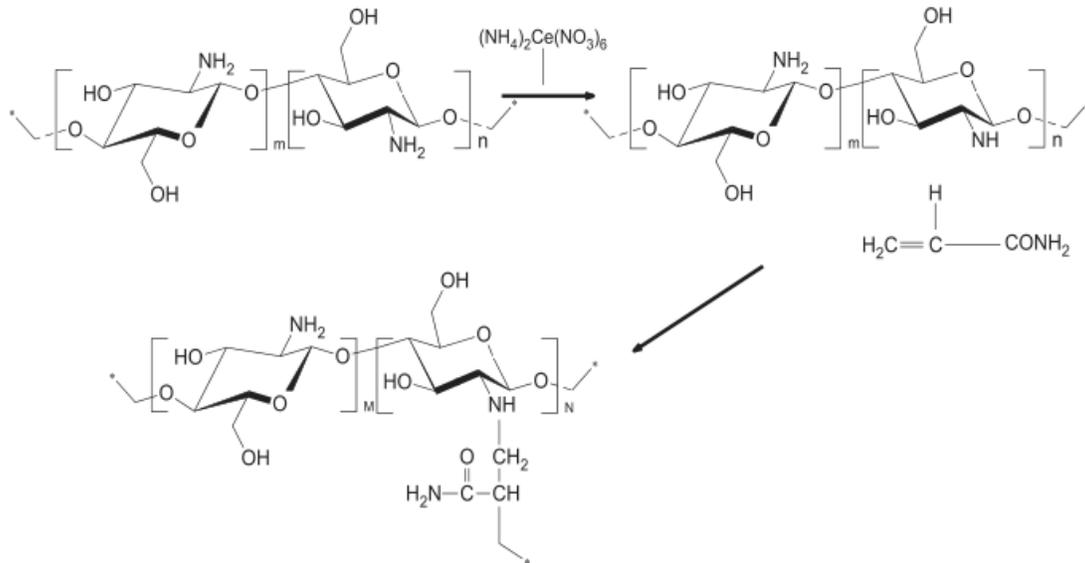


Figura 8. Esquema de la síntesis del CS injertado con poliacrilamida.⁴³

Xiong y col. sintetizaron varios copolímeros de CS injertado con distintos grados de Brij mediante una reacción de amidación de dos pasos en la cual se forman enlaces amida entre el quitosano y el Brij-20. Los resultados obtenidos de la modificación demostraron un incremento en las propiedades fisicoquímicas del CS, además de una mejor solubilidad en soluciones acuosas especialmente en condiciones neutras y alcalinas.⁴⁵

2.2.6 Sistemas formados a partir de CS modificado

Recientemente, diversos autores han propuesto la encapsulación de agentes bioactivos mediante el uso de polisacáridos solubles en agua.^{44,46,47} Estas investigaciones han demostrado que la utilización de estos materiales permite incrementar la capacidad de cargado de fármacos hidrofílicos, transportarlos a sitios específicos y reducir riesgos de toxicidad. Uno de los polisacáridos de más interés para el desarrollo de sistemas de encapsulación de fármacos es el CS. Este material presenta propiedades bactericidas, hemostáticas y anticancerígenas muy útiles para aplicaciones biomédicas. El uso de derivados de CS modificado

hidrofóbicamente permite la fácil formación de nanomicelas estables en medios acuosos.^{48–52}

Dado que la presente investigación busca hacer uso de las propiedades del CS modificado para su potencial aplicación en microemulsiones como sistemas de liberación controlada de fármacos, es importante mencionar algunas de las investigaciones previas relacionadas al tema:

- En 2011, Zhu y col. sintetizaron micelas de CS con grupos folato para la liberación focalizada de fármacos anticancerígenos (fluoresceína e indocianina verde). Las micelas formadas mostraron una capacidad de carga de alrededor de 12 %. Además, la modificación con folato favoreció su capacidad de focalizarse en receptores folatos de tumores.⁵³
- En 2017, Yurong y col. desarrollaron un sistema micelar basado en CS injertado con ciclodextrina (CS-g-CD) y poli(ϵ -caprolactona) terminada en benzimidazol para liberación controlada de fármacos. Las micelas fueron cargadas con doxorrubicina (DOX) mediante interacciones hidrófobas. La eficiencia de encapsulación de DOX fue de 75 % y la liberación fue realizada en pH neutro.⁵⁴
- En 2018, Almeida y col. prepararon micelas anfifílicas autoensamblables basadas en CS injertado con policaprolactona (CS-g-PCL). Las micelas fueron cargadas con paclitaxel (PTX) para lograr una mejor liberación en el tracto intestinal. Los ensayos *in vitro* demostraron que las micelas cargadas con PTX mejoraron la biodisponibilidad y la permeación intestinal del fármaco.⁵⁵
- El mismo año, Thisirak y col. formularon micelas poliméricas a partir de N-naftil,N, O-succinil quitosano (NSCS) y N-octil-N, O-succinil quitosano (OSCS) como acarreadores de curcumina para liberación dirigida en el colón. La liberación de todas las micelas cargadas fue pH dependiente. Se encontró que la liberación de las micelas cargadas en fluidos gástricos simulados y en fluidos intestinales simulados fue significativamente mayor que la liberación

de la curcumina en polvo. Además, se encontró que las micelas cargadas basadas en NSCS poseen mayor actividad anticancerígena contra células de cáncer colorrectal (HT-29).⁵⁶

- Por otro lado, Liu y col. formularon micelas poliméricas polietilenglicol quitosano injertado con ácido lipoico (PEG-CS-LA) con el fin de ser utilizadas como acarreadores de fármacos. Los estudios *in vitro* demostraron que el uso de las micelas permitió mantener la estabilidad y minimizar la pérdida de componentes activos en el sistema circulatorio.⁴⁶

- Pakin y col. sintetizaron CS injertado con éter metílico desoxicólico y polietilenglicol (DCA-CS-mPEG). En base a este polímero, se logró la formación de micelas autoensamblables con una estructura núcleo-coraza. Los estudios *in vitro* de las micelas mostraron liberación controlada y comportamiento pH-sensible. Además, se encontró que el sistema es seguro y eficiente para su uso como acarreador de fármacos.⁵⁷

- Liang y col. sintetizaron un polímero anfífilos basado en glicol quitosano modificado con succinato de α -tocoferol. El material obtenido fue capaz de formar micelas autoensamblables cargadas con paclitaxel. Los estudios *in vitro* demostraron un nivel bajo de toxicidad y un aumento de la dosis de carga de las micelas cargadas.⁴⁷

- Por su parte, Farhangi y col. sintetizaron conjugados de CS injertado con ácidos grasos para la encapsulación de ciprofloxacino en las nanomicelas obtenidas. Posteriormente, se estudió el efecto de los ácidos grasos en las propiedades fisicoquímicas de los conjugados. Como resultado, encontraron que el ciprofloxacino fue exitosamente encapsulado y el efecto antibacteriano fue potencializado por la encapsulación con CS.¹³

- Farideh y col. desarrollaron nanomicelas cargadas con metotrexato (MTX) mediante la modificación de CS para su potencial uso como sistema de liberación de fármacos quimioterapéuticos. Los autores primeramente modificaron el CS con un agente de transferencia de cadena (CTA) para crear

un macroiniciador CS-CTA. Posteriormente, se llevó a cabo la polimerización controlada de ácido itacónico con metacrilato de dimetilaminoetilo y haluro de alquilo de amonio cuaternario (DMAEMAQ) para la generación de las nanomicelas. De la investigación anterior, se verificó la exitosa captación celular de MTX mediante citometría y técnicas de microscopia por lo que se espera que el sistema tenga un gran potencial como agente quimioterapéutico.⁵⁸

- Más recientemente, en 2020, Ching y col. fabricaron nanomicelas para mejorar la eficiencia de carga y la fotoestabilidad acuosa de verde de indocaina (ICG) un tinte utilizado en diagnósticos médicos. Las nanomicelas utilizadas como vehículo del tinte fueron fabricadas por autoensamblaje en solución acuosa pH 7.4 de los conjugados de imina-benzoica conteniendo polietilenglicol quitosano/4-(dodeciloxi)benzaldehído (DBA). Las micelas poliméricas mostraron propiedades importantes incluida la inhibición de la pérdida de ICG bajo condiciones fisiológicas y condiciones ácidas, biocompatibilidad favorable y efecto de hipertermia fotoactiva.⁵⁹

Con base en estos antecedentes, la presente investigación pretende llevar a cabo la modificación de CS utilizando un tensoactivo no iónico (Brij 35) mediante una reacción de amidación con la finalidad de obtener un material de carácter anfifílico capaz de formar microemulsiones biocompatibles.

III. HIPÓTESIS

Es posible la modificación de CS a partir de un tensoactivo de tipo no iónico para su futuro uso en la preparación de microemulsiones.

IV. OBJETIVO GENERAL

Modificar CS mediante el injerto de un tensoactivo de tipo no iónico en su cadena principal, para su posible uso en la preparación de microemulsiones.

4.1 Objetivos Específicos

1. Funcionalizar el surfactante no-iónico Brij 35 con anhídrido succínico (SA).

2. Modificar CS con el surfactante-SA mediante una reacción de amidación.
3. Caracterizar los materiales obtenidos mediante resonancia magnética nuclear de protón (^1H NMR), espectroscopia de infrarrojo (FT-IR), difracción de rayos X (XRD) y análisis termogravimétrico (TGA).
4. Determinar la concentración micelar crítica (CMC) de los materiales de quitosano modificados mediante densidad, pH, conductividad y tensión superficial.

V. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la figura 1 se muestra el procedimiento de manera general a seguir.

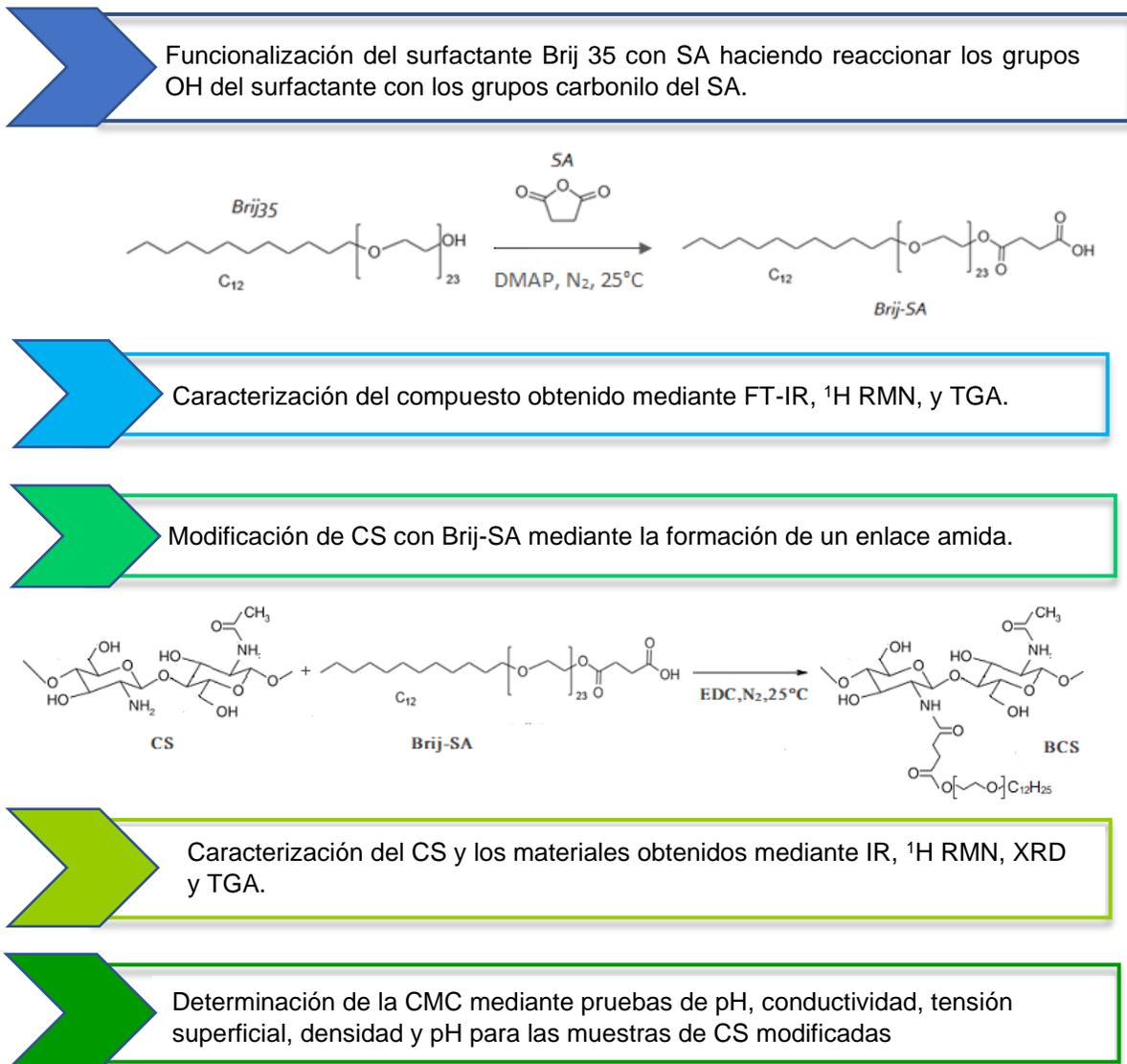


Figura 9. Esquematación del desarrollo experimental.

En este apartado se presentan los materiales utilizados para el desarrollo experimental de la presente tesis y se describen los métodos y técnicas para la obtención y caracterización de los materiales.

El proyecto consiste en la modificación de CS mediante el injerto de un tensoactivo de tipo no iónico (Brij-SA) para la posible fabricación de microemulsiones biocompatibles (Fig.9).

5.1 Funcionalización de Brij 35 con SA (Brij-SA)

La funcionalización de Brij 35 fue realizada mediante una reacción de acilación del Brij 35 con anhídrido succínico (SA) formando un éster y un ácido carboxílico en un extremo de la molécula (Fig.10).

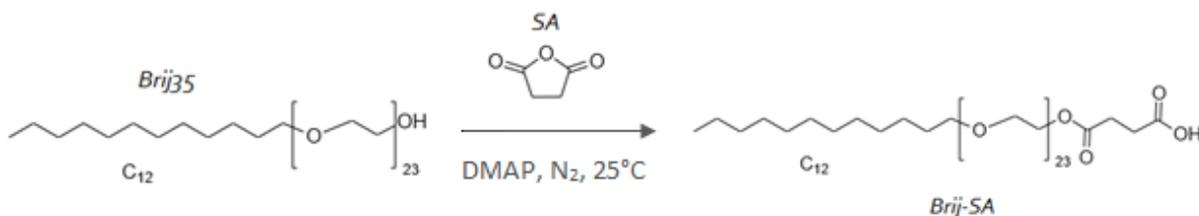


Figura 10. Esquema de funcionalización del Brij 35 con Anhídrido succínico (SA).

En un matraz bola conteniendo 20 mL de diclorometano (DCM), se agregó el Brij 35 (1 mmol, 1.29 g), SA (1 mmol, 0.10 g) y 4-dimetil amino piridina (DMAP, 1 mmol, 0.12 g). Posteriormente, la mezcla se dejó reaccionar bajo agitación constante a 25 °C por 24 h en atmósfera de nitrógeno. Enseguida, la mezcla fue colocada en un embudo de separación y fue lavada dos veces con una solución acuosa de HCl (10 %). La parte orgánica fue recolectada y secada por 24 h para obtener el compuesto Brij-SA. De la reacción se obtuvieron 1.063 g (0.818 mmol) de Brij-SA lo cual corresponde a un rendimiento del 77 %.

5.2 Injerto de Brij-SA en CS.

La síntesis de CS modificado con Brij-SA (BCS) se logró mediante una reacción de amidación. Una vez funcionalizado el surfactante, el ácido carboxílico del Brij-SA

reaccionó con los grupos amino del CS mediante la formación de enlaces amida entre el CS y el Brij-SA. (Fig. 11)

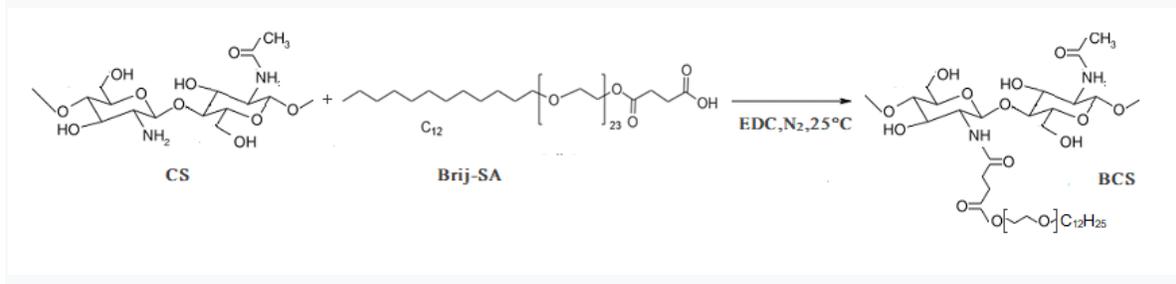


Figura 11. Esquema de la modificación del CS mediante el injerto de Brij-SA

Primeramente, se activó el compuesto Brij-SA (1mmol, 1.29 g) en presencia de hidrocloreuro de N- (3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida (EDC) (1.2 mmol, 0.23 g) en un matraz de bola conteniendo 5 mL de DCM. La solución se dejó reaccionar con agitación constante por 24 h a 25 °C y posteriormente se evaporó durante 24 h a temperatura ambiente para la eliminación de DCM.

Posteriormente, se sintetizaron varios sistemas de BCS con diferente grado de injerto utilizando distinta relación molar Brij-SA: CS (1:3 1:7, 1:14, 1:29 y 1:60). Los cálculos fueron realizados tomando en cuenta el peso molecular del Brij-SA (1,299 g/mol) y el peso molecular promedio de la unidad monomérica (u.m) del CS (176.8 g/mol). Se consideró el uso del peso molecular promedio de la u.m en base a reportes previamente publicados.^{60,61}

El cálculo del peso molecular promedio de la unidad monomérica del CS se realizó mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 1

Peso molecular promedio de unidad monomérica.

$$M_o(u.m) = 161.2(DD) + 203.2(1 - DD)$$

En donde el peso molecular relativo de la unidad repetitiva deacetilada y acetilada fue 161.2 y 203.2 respectivamente.⁶⁰ Mientras que el grado de deacetilación (DD) del CS fue de 75 % el cual fue calculado por la técnica de ¹H RMN.

Para la preparación de la muestra BCS_{1:3} el Brij-SA (0.346 mmol, 0.45 g) activado con EDC se solubilizó en 10 mL de una solución de CS (1.131 mmol u.m, 0.20 g) en ácido acético al 1 %. Entonces, la solución se hizo reaccionar con agitación constante a temperatura ambiente por 24 h. Una vez llevada a cabo la reacción, la solución se dializó en agua destilada por 72 h y posteriormente se liofilizó para la obtención de los materiales de BCS.

El resto de las muestras fueron preparadas con el mismo método. La Tabla 2 muestra las relaciones molares y en peso, así como las cantidades usadas de CS y Brij-SA para cada uno de los BCS preparados.

Tabla 1. Composición, relación molar y relación peso de las muestras de CS modificado.

Muestra	Relación en peso	Relación molar	Cantidad	
			Brij-SA	CS
BCS_{1:7}	1:1	1:7.3	0.12 g (0.092 mmol)	0.12 g (0.678 mmol)
BCS_{1:14}	1:2	1:14.1	0.063 g (0.048 mmol)	0.12 g (0.678 mmol)
BCS_{1:29}	1:4	1:29.4	0.031 g (0.023 mmol)	0.12 g (0.678 mmol)
BCS_{1:60}	1:8	1:60	0.015 g (0.011 mmol)	0.12 g (0.678 mmol)

5.3 Determinación de la CMC del BCS

La determinación de la CMC del sistema BCS_{1:7} se llevó a cabo mediante estudios de tensión superficial, conductividad eléctrica, medición de pH y estudios de densidad. Se prepararon soluciones con concentraciones de 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 mg/mL de BCS preparado con una relación molar Brij-SA:CS 1:7. Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente (25 °C).

5.4 Técnicas de caracterización

5.4.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

El quitosano y los materiales obtenidos fueron caracterizados mediante FT-IR, esta técnica permite corroborar la presencia de grupos funcionales. La técnica de FT-IR se basa en el principio de que casi todas las moléculas pueden absorber radiación infrarroja la cual se convierte en una vibración molecular característica con la cual se pueden conocer los grupos funcionales presentes en la molécula. Los espectros

infrarrojos se obtuvieron por ATR (reflexión total atenuada). En este modo las muestras pueden permanecer en su estado natural por lo que no se necesita preparar la muestra únicamente se coloca en el cristal del ATR. El análisis de las muestras se realizó en un espectrómetro infrarrojo marca Nicolet Magna– IR TM Spectrometer 550 con las condiciones siguientes: 32 “scans” con resolución de 4 cm^{-1} en la región del espectro de 4000 a 400 cm^{-1} .

5.4.2 Resonancia Magnética Nuclear de protón (^1H RMN)

Los distintos materiales utilizados y obtenidos fueron analizados mediante ^1H RMN. Esta técnica es ampliamente utilizada para determinar la estructura de las moléculas mediante el fundamento de que algunos núcleos existen en un estado de spin nuclear específico cuando son expuestos a un campo magnético externo.

El CS fue analizado mediante ^1H RMN para corroborar su identidad y para calcular su grado de deacetilación. También, se analizó el Brij 35 y el Brij funcionalizado con SA. Además, se evaluaron los materiales modificados BCS, así como el porcentaje de tensoactivo injertado sobre el polímero. Los espectros se obtuvieron utilizando un equipo Bruker Avance III con frecuencia de 500 MHz. Para esto, las muestras del surfactante modificado y sin modificar fueron disueltas en cloroformo deuterado (CDCl_3) mientras que las muestras de CS modificado y sin modificar se disolvieron en una mezcla de agua deuterada y ácido clorhídrico (relación $\text{D}_2\text{O}:\text{HCl}$ 98:2 v/v).

5.4.3 Difracción de rayos X

Se evaluó la cristalinidad del CS por difracción de rayos X (XRD) para observar cambios en la estructura cristalina del CS después de ser modificado. Esta técnica se basa en la interacción de la estructura cristalina de un sólido con una fuente de rayos X. El difractograma resultante proporciona información de la estructura cristalina del sólido con base en el ángulo y la intensidad de la difracción.

Las pruebas se realizaron en un difractómetro Rigaku Ultima IV (radiación $\text{CuK}\alpha$) operado a 40 kV y 44 mA en un intervalo angular de 10 a 80° en 2θ . Las muestras fueron colocadas directamente en la celda del equipo y no necesitaron preparación previa.

5.4.4 Análisis Termogravimétrico

Por otro lado, se realizaron análisis de TGA para conocer la estabilidad y propiedades térmicas de los materiales modificados respecto al CS puro. En esta técnica se mide la masa (pérdida o ganancia) de una muestra cuando ésta es sometida a un programa de temperatura controlada. Para este análisis se utilizó un equipo TA Instruments modelo Q500 en el intervalo térmico de 25 a 600 °C con una rampa de temperatura de 10 °C/min en atmósfera de nitrógeno.

5.5 Concentración Micelar Crítica

Para la determinación de la CMC se prepararon distintas diluciones (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/mL) de BCS 1:7 en agua milli-Q; todas las disoluciones se realizaron a temperatura ambiente. Posteriormente, se midieron por densidad, pH, conductividad y tensión superficial. La densidad de las muestras fue medida con un densímetro Anton Paar modelo DMA 5000 con tubo-U oscilante, provisto con corrección automática de la viscosidad, integrado con dos termómetros de platino Pt 100 (rastreado al Servicio de Calibración Alemán, DKD), con una precisión inicial de $5 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$. La temperatura del densímetro es regulada a (\pm) 0.001 K con un termostato de estado sólido. El densímetro fue calibrado con aire seco y con agua desgasificada bidestilada. El equipo tomó de forma automática la muestra líquida para posteriormente introducirla dentro de un tubo-U el cual es inducido a vibrar, la frecuencia de oscilación del tubo es influenciada por la masa y por ende por la densidad de la muestra. Las mediciones de pH y conductividad se realizaron en un potenciómetro de mesa Hanna Edge 2020-01. El equipo fue previamente calibrado con soluciones buffer de pH 4, 7 y 10. Todas las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente (25 °C). Finalmente, las mediciones de tensión superficial se realizaron con un tensiómetro de burbuja Sensa Dyne PCL500 el cual fue calibrado para regular la temperatura con agua caliente y fría y posteriormente con agua y metanol.

VI. RESULTADOS

6.1 Caracterización del CS

El CS utilizado para la presente investigación fue obtenido de forma comercial por Sigma Aldrich México de bajo peso molecular, 50,000-190,000 Da basado en la viscosidad. Se realizó su caracterización mediante FT-IR y RMN con la finalidad de confirmar la identidad del polímero.

6.1.1 Caracterización del CS mediante FT- IR

El espectro de IR del CS fue obtenido mediante la técnica de ATR. La muestra no recibió preparación previa ya que la técnica ATR no lo requiere. En la Fig.12 se observa el espectro infrarrojo del CS puro.

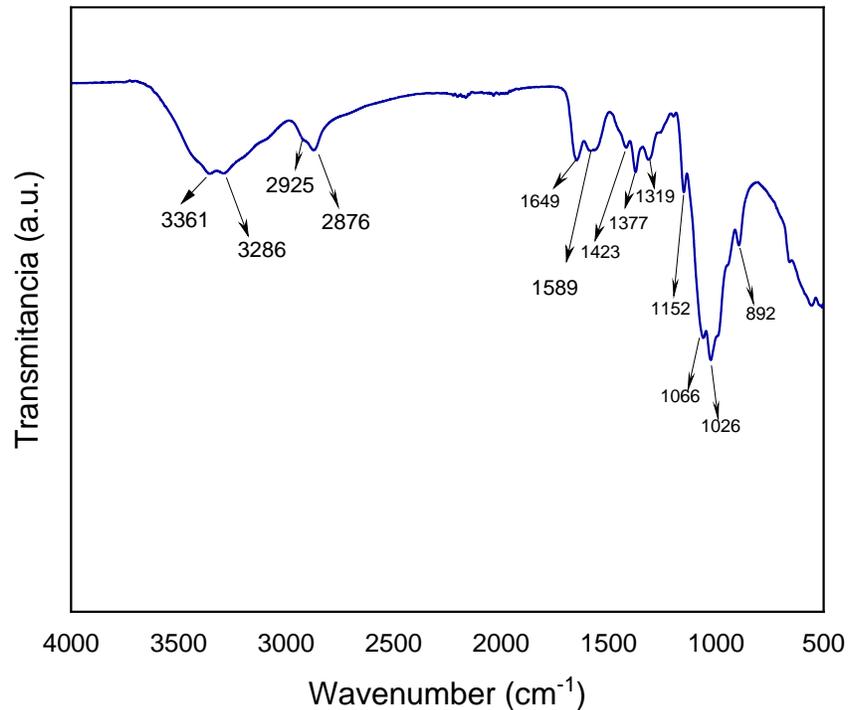


Figura 12. Espectro de FT-IR del CS.

El espectro de FT-IR mostró una banda ancha en la región de 3361-3286 cm⁻¹ correspondientes a los estiramientos de los enlaces N-H y O-H. Las bandas de absorción presentes entre 2925 y 2876 cm⁻¹ fueron atribuidas a los estiramientos simétricos y asimétricos respectivamente de los enlaces C-H en las unidades de glucosamina. La presencia de grupos N-acetilo fueron confirmados por las bandas

alrededor de los 1649 cm^{-1} (estiramiento C=O, amida I) y en 1589 cm^{-1} (torsión N-H, amida II) de las unidades acetiladas del CS. También, se confirmaron las torsiones de los enlaces C-H de los grupos CH_2 y CH_3 por la presencia de bandas agudas en 1423 y 1377 cm^{-1} respectivamente. La banda observada en 1152 cm^{-1} puede ser atribuida al estiramiento asimétrico del enlace C-O-C mientras que las bandas en 1066 y 1026 cm^{-1} corresponden al estiramiento del enlace C-O.

6.1.2 Caracterización del CS mediante RMN de protón

Para obtener el espectro de RMN de protón se disolvieron 10 mg de CS en una mezcla de agua deuterada (D_2O) y ácido clorhídrico (relación $\text{D}_2\text{O}:\text{HCl}$ 98:2 v/v) posteriormente se analizó en un equipo Bruker Avance III con frecuencia de 500 MHz. Su espectro se muestra en la Fig.13.

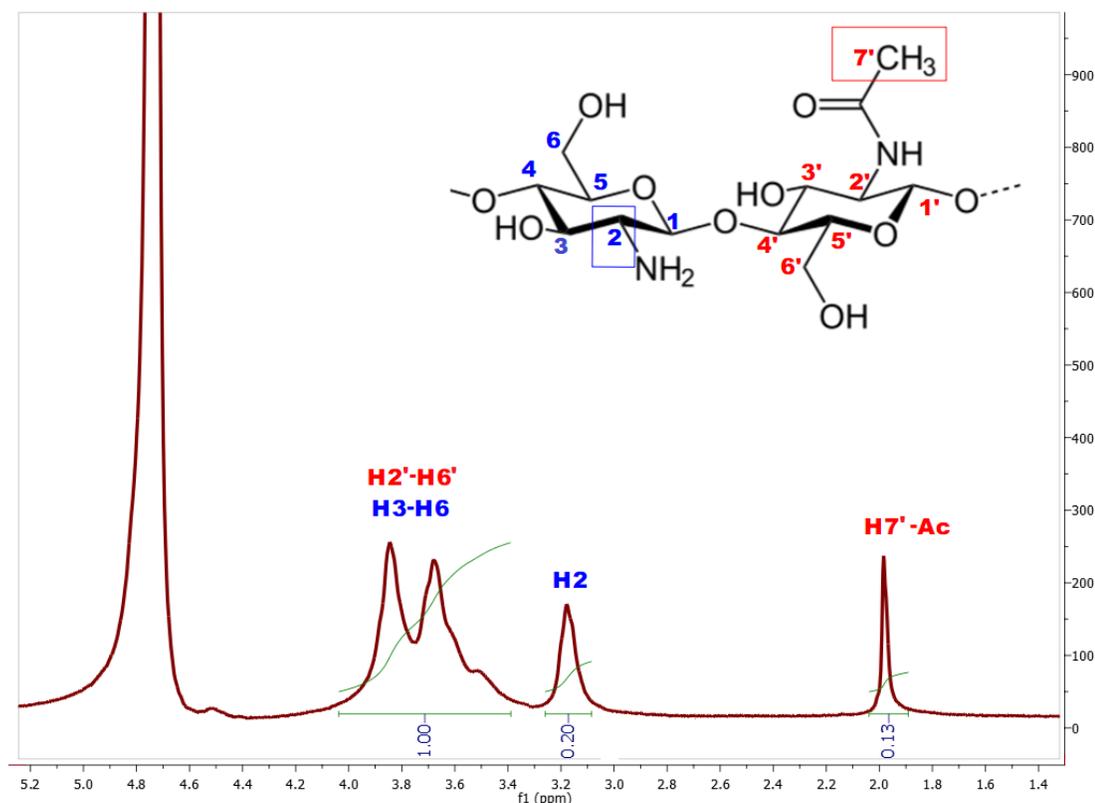


Figura 13. Espectro de ^1H RMN del CS (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}:\text{HCl}$ 98:2 v/v, 25°C)

El espectro mostró una señal en 1.9 ppm correspondiente a los protones del grupo metilo (H7) presentes en el anillo de la glucosamina acetilada (GlcNAc), así como una señal en 3.2 ppm proveniente del H2 presente en el anillo de la glucosamina

sin acetilar (GlcN). Además, se observan múltiples señales entre 3.6 - 3.8 ppm correspondientes a los protones de los carbonos de los anillos de glucosa. La señal perteneciente al protón anomérico del anillo deacetilado aparece en 5.2 ppm, mientras que la señal del protón anomérico del anillo acetilado aparece en 5 ppm. Sin embargo, en el presente espectro no se observan estas señales debido a la posible superposición de la señal en 4.7 ppm perteneciente al disolvente.

6.1.3 Determinación del DD del CS

Anteriormente se ha hablado de la importancia de conocer el grado de deacetilación del CS. Este factor determina en gran medida las propiedades del material y a su vez permite conocer las aplicaciones en las que este puede ser utilizado. La fracción molar de las unidades N-acetilglucosamina en la cadena del CS, se define como:

Ecuación 2

$$DD = 100 \frac{nGlcN}{nGlcN + GlcNAc}$$

En donde nGlcN es el número promedio de unidades D-glucosamina y nGlcNAc es el número promedio de unidades de N-acetilglucosamina. Por otro lado, el grado de acetilación (DA) viene dado por la formula $DA=100-DD$.⁶²

Existen distintos métodos utilizados para la determinación del DD del CS. Actualmente el método con mayor precisión es el realizado por medio de RMN de protón.⁶²⁻⁶⁵ En el método por RMN ¹H utilizado por Lavertu y col.⁶⁵, la cantidad utilizada de CS no necesita ser conocida, tampoco se necesita determinar las impurezas de la muestra mientras que esas señales no se traslapen con las características del CS. La muestra se prepara con solo algunos miligramos de CS y no es necesario utilizar una curva de calibración para conocer el DD.

Para realizar el cálculo del DD se utilizan las integrales de los picos del protón H1 del anillo deacetilado en 5.2 ppm y el pico de los tres protones del grupo acetilado H Ac en 1.9 ppm.

Ecuación 3

$$DD(\%) = \left(\frac{H1D}{H1D + \frac{HAc}{3}} \right) \times 100$$

Existen otros métodos como el propuesto por Hirai y col.⁶⁶ en donde se utilizan las señales de los protones H2,H3,H4,H5,H6 (H26) entre 3.6-3.8 ppm de ambos anillos y el pico del grupo acetilo (H-Ac) en 1.9 ppm.:

Ecuación 4

$$DD(\%) = \left(1 - \left(\frac{\frac{1}{3}HAc}{\frac{1}{6}H26} \right) \right) \times 100$$

Otro método es el utilizado por Biskup y col.⁶² en donde utilizan las integrales de las señales presentes en 1.9 ppm. (H-Ac) y 3.2 ppm. (H2- GlnN).

Ecuación 5

$$DD(\%) = \left(1 - \left(\frac{\frac{1}{3}HAc}{H2 - GlnN} \right) \right) \times 100$$

En la presente investigación se utilizaron las ecuaciones 4 y 5 para determinar el DD del CS. De acuerdo con la información obtenida por RMN se encontró que el DD del CS se encuentra en el intervalo entre 74 y el 78 % lo cual concuerda con lo reportado por el distribuidor (≥ 75 %). (Tabla 2)

Tabla 2. Desplazamiento químico y porciento de deacetilación del CS.

Protón	Desplazamiento Químico (ppm)	Integración	DD (%)
H1 Ac	1.9	0.13	74 % (Ec. 4)
H 2-6	3.6-3.8	1.00	

<i>H1 Ac</i>	1.9	0.13	78% (Ec. 5)
<i>H2- GlnN</i>	3.2	0.20	

6.2 Funcionalización del Brij con SA.

Para lograr la correcta modificación del CS primero se debe funcionalizar el Brij 35 con SA. En este proceso los grupos OH del Brij 35 reaccionan con SA formando un ácido carboxílico en uno extremo de la molécula. (Fig.9)

Para comprobar esta funcionalización se realizaron análisis mediante FT-IR y ¹H RMN.

6.2.1 Caracterización del Brij-SA mediante FT- IR

Los espectros IR de las muestras Brij 35, SA y Brij-SA fueron obtenidos mediante la técnica de ATR. Las muestras no recibieron preparación previa.

En la Fig.14 se muestran tres espectros que corresponden al Brij 35, SA y Brij-SA, respectivamente, con la finalidad de observar los grupos funcionales presentes en el Brij 35 y en el SA y posteriormente compararlos para corroborar la correcta funcionalización del surfactante.

El espectro de SA mostró picos característicos en 1861 y 1779 cm⁻¹ relacionados con los estiramientos simétricos y asimétricos respectivamente de los enlaces C=O del anhídrido. También, se observó una señal en 1418 cm⁻¹ correspondiente al estiramiento de los enlaces C-(C=O)-O y alrededor de 2970 cm⁻¹ se observó la señal de los estiramientos los enlaces C-H.

Por otro lado, el espectro perteneciente al Brij 35 mostró tres bandas principales en 2880, 1106, y 1060 cm⁻¹ debidas a los estiramientos de los enlaces C-H, C-O-C y C-O, respectivamente. Además, en 3445 cm⁻¹ se observa una señal característica del estiramiento del grupo O-H.

Al comparar los espectros del Brij 35 y del SA con el espectro del Brij-SA se puede observar la presencia de las dos señales características del Brij 35 (2880 y 1106 cm⁻¹) así como la señal característica del grupo C=O del SA con un ligero desplazamiento hacia 1729 cm⁻¹. Además, nuevamente se observa la señal en 3445

cm^{-1} del grupo O-H perteneciente al ácido carboxílico. La presencia de estas señales confirmó la correcta funcionalización del Brij 35 con SA.

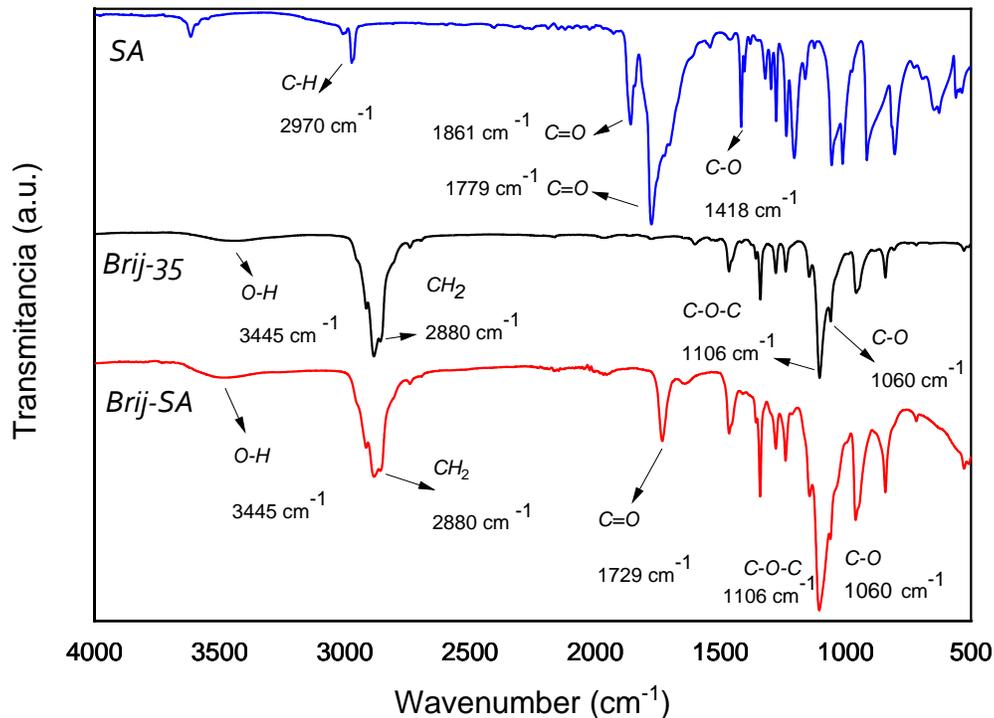


Figura 14. Espectro FT-IR de SA, Brij 35 y Brij-SA CS.

6.2.2 Caracterización del Brij-SA mediante RMN (^1H)

La técnica de RMN se utilizó para corroborar la modificación de Brij 35 con SA. Para realizar los análisis por ^1H RMN se disolvieron 10 mg de cada muestra en CDCl_3 .

En la Fig.15 se muestran los espectros de Brij 35 y Brij- SA. El espectro del Brij 35 mostró señales características en 3.4 ppm y 1.05 ppm las cuales pertenecen a los protones del grupo metileno adyacentes al oxígeno ($-\text{CH}_2\text{O}$) marcado como **H3** y a los protones del grupo metileno ($-\text{CH}_3$) marcados como **H6** presentes en la cadena alquílica del Brij 35 respectivamente.

Por otro lado, el espectro del Brij-SA muestra nuevamente las señales características en 3.3 ($-\text{CH}_2\text{O}$) y 1.05 ($-\text{CH}_3$) ppm del Brij 35 junto con una nueva señal en 2.7 (**H7**) la cual pertenece al CH_2 adyacente al grupo carbonilo del SA.

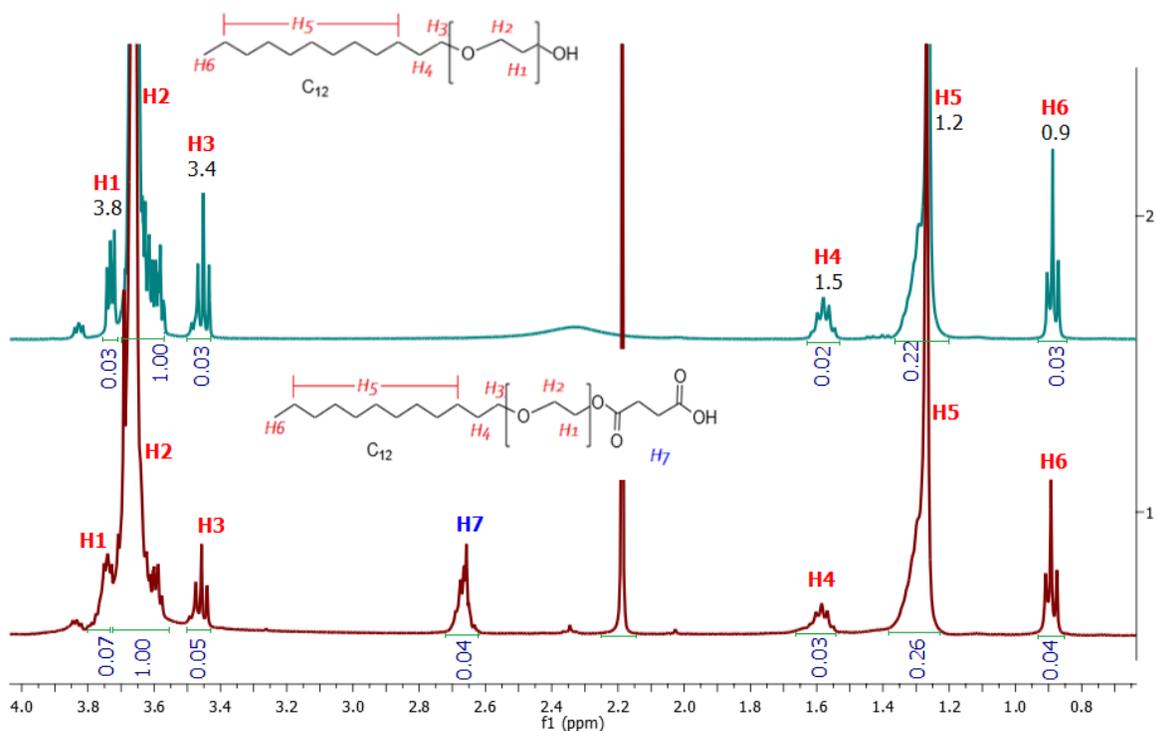


Figura 15. Espectro RMN (^1H) del Brij 35, Brij-SA (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C).

La tabla 3 muestra los grupos funcionales relacionados con las señales en el espectro RMN de la Fig.15.

Tabla 3. Señales observadas en RMN y sus respectivos grupos funcionales para Brij 35 y Brij 35 modificado con SA.

Material	Desplazamiento químico (δ) (ppm)	Protón asignado
Brij 35	3.8	H1 $-\text{[CH}_2\text{CH}_2\text{-]OH}$
	3.6	H2 $-\text{[CH}_2\text{CH}_2\text{-]OH}$
	1.2	H3 $-\text{CH}_2\text{-O-}$
	1.05	H4 $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$
		H5 $-\text{CH}_2\text{-}$
		H6 $\text{CH}_3\text{-CH}_2$
Brij-SA	2.7	H7 $(-\text{CH}_2\text{-C=O})$

6.3 Modificación del CS con Brij-SA

La modificación del CS se llevó a cabo mediante una reacción de amidación en dos pasos. Primeramente, se logró la funcionalización del surfactante (Brij-SA) en donde se obtuvo un ácido carboxílico, posteriormente, el ácido carboxílico del Brij-SA reaccionó con los grupos amino del CS mediante la formación de enlaces amida entre el CS y el Brij-SA. De esta forma, se logró injertar el surfactante a la cadena estructural del CS. (Fig. 10)

Para comprobar la correcta modificación del CS los materiales fueron caracterizados mediante FT-IR y por RMN (^1H).

6.3.1 Caracterización mediante FT-IR del CS modificado (BCS)

Se sintetizaron varios materiales de BCS con distintos grados de injerto empleando diferente relación molar de Brij-SA:CS (1:3, 1:7, 1:14, 1:29 y 1:60). Para la caracterización por FT-IR se utilizó el espectro del CS puro para su comparación con los espectros obtenidos de los nuevos materiales. (Fig.16) Los espectros IR de las muestras del CS modificado fueron obtenidos mediante la técnica de ATR y no recibieron ninguna preparación previa.

El espectro del CS sin modificar mostró picos característicos en 1646 y 1580 cm^{-1} correspondientes al estiramiento $\text{C}=\text{O}$ (amida I) y torsión N-H (amida II) respectivamente mientras que en el espectro de los materiales de BCS se observaron nuevas bandas de absorción provenientes del Brij-SA en 1060 y 1024 cm^{-1} asignadas a las vibraciones de los estiramientos C-O-C y C-O respectivamente. Además, se observó la aparición de una banda en 1541 cm^{-1} la cual corresponde a la torsión del enlace N-H del grupo amida formado entre CS y Brij-SA así como y una señal en 1412 cm^{-1} debida a la torsión del enlace C-H de los grupos $-\text{CH}_2$ del Brij 35. Los espectros obtenidos del BCS 1:7, 1:14 y 1:60 mostraron las mismas señales con diferente intensidad lo cual puede ser explicado por la diferencia en la concentración de los componentes. La comparación de los espectros del BCS con el CS puro sugiere que la modificación del CS se realizó correctamente.

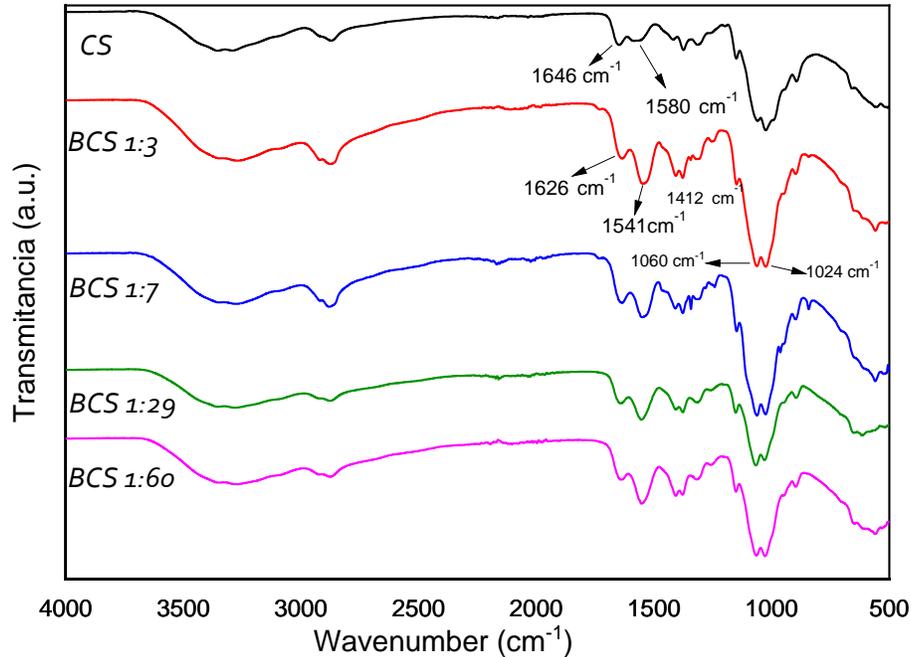


Figura 16. Espectros de FT-IR de CS y BCS sintetizados con diferente proporción en relación molar de Brij-SA:CS CS.

6.3.2 Caracterización del CS modificado por RMN (¹H)

Los espectros de RMN (¹H) del CS y BCS sintetizados con diferente relación molar de Brij-SA:CS se exhiben en la Fig.17. Para obtener los espectros por ¹H RMN se disolvieron 10 mg de cada muestra en una mezcla de D₂O:HCl 98:2 v/v.

El espectro del CS mostró señales en 1.9 ppm correspondientes a los protones del grupo metilo de la glucosamina acetilada (GlcNAc) y en 3.2 ppm del H2 en la glucosamina sin acetilar (GlcN). Además, se observan múltiples señales traslapadas de 3.5 a 3.9 ppm correspondientes a los protones sobre los carbonos de los anillos de glucosa.

Por su parte, los espectros de las muestras de BCS mostraron una señal adicional en 1.1 ppm atribuida a los protones de los grupos -CH₃ de la cadena alquílica presente en el Brij-SA junto con un ligero desplazamiento de la señal en 3.2 debido al cambio en el ambiente químico lo cual sugiere la correcta modificación del CS con el tensoactivo. Adicionalmente, se puede apreciar la disminución en la esta

señal conforme la proporción Brij-SA:CS cambia. Esto puede explicarse ya que al disminuir la cantidad de tensoactivo disminuye la cantidad de Brij-SA injertado y por lo tanto la cantidad de grupos CH₃.

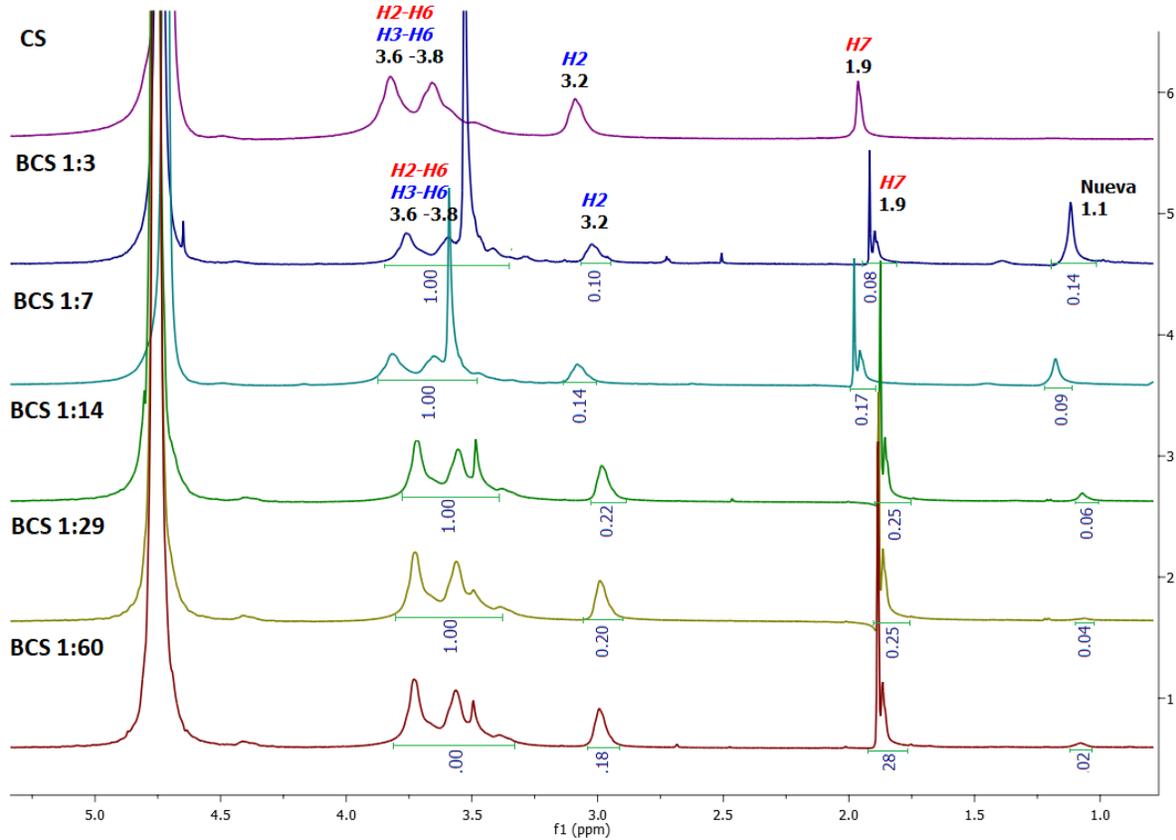


Figura 17. Espectros de RMN de protón para muestras de BCS obtenidos con diferente composición en relación molar de Brij-SA:CS (500 MHz, D₂O:HCl 98:2 v/v, 25°C).

En la tabla 4 se puede observar la asignación de las señales obtenidas por RMN.

Tabla 4. Señales observadas en RMN y sus respectivos grupos funcionales del CS antes y después de ser modificado.

Material	Desplazamiento químico (δ) (ppm)	Brij-SA
CS	1.9	-C(=O)CH ₃
	3.2	H ₂
	3.6-3.8	H ₂ -H ₆ H ₃ -H ₆
BCS	1.1	-CH ₃ (Brij-SA)

El porcentaje de injerto (GD) de Brij-SA sobre el CS se determinó mediante la comparación de las señales del CS y del Brij-SA y se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%GD = \frac{I_{1.1} \div 3}{I_{3.2}} \times 100$$

En donde $I_{1.1}$ es la integral del pico característico del Brij-SA perteneciente al grupo CH_3 presente en la cadena alquílica del surfactante la cual es dividida entre 3 (por el número de protones presentes en el grupo metilo) mientras que $I_{3.2}$ es la integral de la señal en 3.2 ppm del grupo CH presente en el anillo deacetilado del CS.

En la tabla 5 se muestra el grado de injerto calculado por RMN a partir de las integraciones de la figura 18.

Tabla 5. Porcentaje de injerto de Brij-SA en BCS obtenidos a diferente relación en peso de Brij-SA:CS.

Muestra	Relación molar Brij-SA:CS (u.m.)	Grado de Injerto Teórico (%)	Grado de Injerto (%) ^a	Grado de Injerto promedio (%)
BCS _{1:3}	1:3	44	46	47 (± 3.6)
BCS _{1:7}	1:7	19	21.4	22 (± 2)
BCS _{1:14}	1:14	9	9	9 (± 0.3)
BCS _{1:29}	1:29	4	6.6	7 (± 2.6)
BCS _{1:60}	1:60	2	3	4 (± 2.6)

^a Calculado a partir de las integraciones de figura 18

De esta tabla se puede observar que al aumentar la proporción de polímero (disminución de la cantidad de Brij-SA), el porcentaje de injerto disminuye debido a que existe una cantidad menor de Brij-SA para reaccionar con las macromoléculas de CS. Además, de acuerdo a los cálculos obtenidos mediante RMN, se encontró que el porcentaje de Brij-SA injertado en la cadena de CS en la mayoría de los casos fue ligeramente mayor al calculado teóricamente. Esto pudiera deberse a Brij-SA residual que no se logró dializar durante el proceso de purificación de los materiales o bien pudiera deberse al error experimental durante el pesado de los correspondientes reactivos. Una columna con el grado de injerto promedio y su

desviación estándar ($n=3$) es mostrada adicionalmente. Estos valores fueron calculados a partir de varias mediciones en las integraciones a partir del espectro de RMN para cada una de las muestras. Como se puede apreciar, los valores de injerto de Brij-SA en CS son congruentes con el grado de injerto teórico esperado.

6.3 Difracción de rayos X (XDR)

Se realizó un análisis mediante XRD de los materiales iniciales (Brij y CS) así como de los materiales modificados (BCS) para estudiar los cambios en la estructura cristalina del CS antes y después de ser modificado.

El difractograma del CS mostró una señal intensa en 19.8° y otras dos señales anchas en 9.9 y 26.8 indicando que el CS posee una estructura cristalina (Fig.18). Por su parte, el Brij 35 muestra dos señales agudas e intensas en 20 y 23° sugiriendo que este compuesto presenta una estructura cristalina definida.

Comparativamente, el difractograma del BCS con una relación molar Brij-SA-CS de 1:7 exhibió cambios en la intensidad y amplitud de sus señales correspondientes al CS. El pico característico del CS en 19.5° decrece en intensidad mientras que su anchura se incrementa. Además, se observa una nueva señal en 23.3° proveniente del Brij 35 lo cual provoca que las señales sean menos definidas y más anchas. Este mismo comportamiento, se observó para las muestras de BCS 1:14, 1:29, 1:60.

Por lo anterior, se puede inferir que la modificación química del CS con Brij 35 le confiere una estructura mayormente amorfa al material final disminuyendo la cristalinidad original del CS.

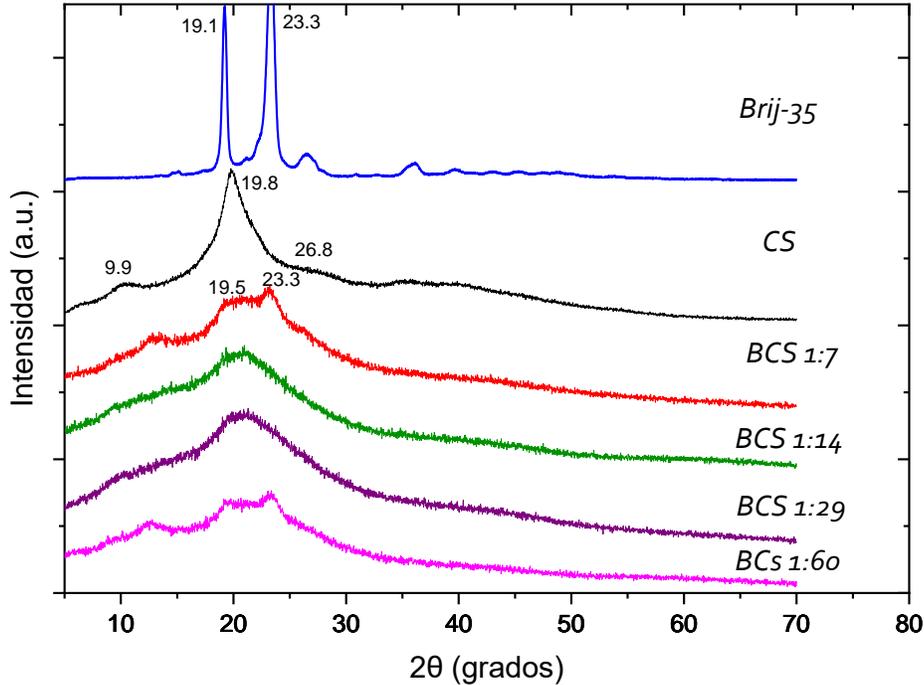


Figura 18. Difractogramas de Brij 35, CS y BCS obtenidos con diferente relación molar de Brij-SA:CS.

6.4 Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis mediante TGA se realizó con la finalidad de conocer la estabilidad y propiedades térmicas de los materiales modificados. En la Fig. 19 se observan los termogramas del CS y del Brij 35. En el termograma del CS se observó una primera pérdida de peso en el intervalo de 25-100 °C correspondiente a la pérdida de humedad contenida en la muestra. Posteriormente, se observó una segunda pérdida entre 250-400 °C la cual es atribuida a la descomposición de la cadena principal del CS. La derivada de la curva de TGA (curva en color rojo) permitió identificar de una manera más clara las temperaturas de descomposición, así como las diferentes pérdidas en peso de la muestra. En el caso del CS se observó que su temperatura máxima de descomposición fue en 294.6 °C. Mientras que, el termograma del Brij 35 muestra una única pérdida de peso principal entre 300 – 450 °C con una temperatura de descomposición de 389 °C.

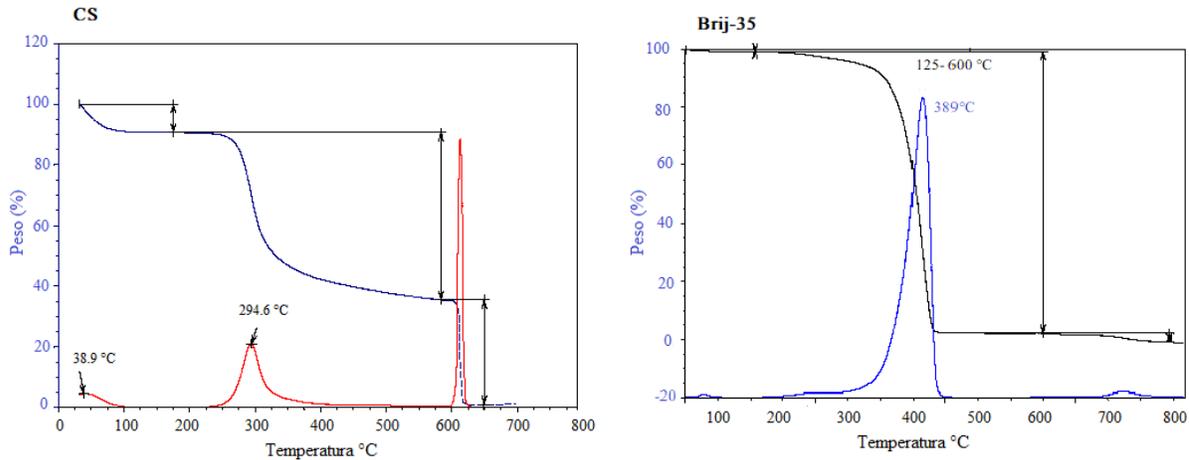


Figura 19. Curvas de TGA del CS y Brij 35.

Por otro lado, en la Fig. 20 se comparan los termogramas de los BCS obtenidos con relación molar Brij-SA:CS (u.m) de 1:7, 1:14, 1:29 y 1:60. A diferencia del termograma del CS, la muestra de BCS $1:14$ presentó 3 pérdidas de peso. La primera se presentó entre 25-100 °C la cual es atribuida a la pérdida de humedad de la muestra. Posteriormente, se observó una nueva pérdida entre 220 – 270 °C atribuida probablemente a la descomposición del CS y la tercera alrededor de 280-400°C la cual pudiera deberse a la descomposición del Brij-SA. Debido a la similitud de la temperatura de descomposición de los dos componentes de la muestra (Brij-SA y CS) es difícil observar claramente las dos pérdidas de peso, sin embargo, la muestra presentó dos temperaturas de descomposición en 258.9 °C y en 295.1 °C las cuales corresponden probablemente a las temperaturas de descomposición de CS y Brij-SA respectivamente. La presencia de estas dos señales sugiere la existencia de dos componentes en la muestra.

Un comportamiento similar fue observado para la muestra de BCS $1:7$ la cual presentó nuevamente tres pérdidas en peso. La primera en un intervalo entre 25-100°C (humedad), la segunda en 200–290 °C (debida a CS) y finalmente un de 300-400 °C (debida a Brij-SA). Además, de acuerdo a la derivada de la curva, se encontraron dos señales separadas y definidas con temperaturas de descomposición en 264.2 y 385.8 °C debidas probablemente a la presencia de CS y Brij-SA respectivamente. La separación de estas dos señales se debe

probablemente a la presencia de una mayor proporción de Brij-SA en comparación con la muestra de BCS_{1:14}.

Por otro lado, las muestras BCS_{1:29} y BCS_{1:60} presentaron temperaturas de descomposición en 266.1 °C y 276.5 °C respectivamente. Estos valores pudieran deberse a la descomposición del CS en la muestra.

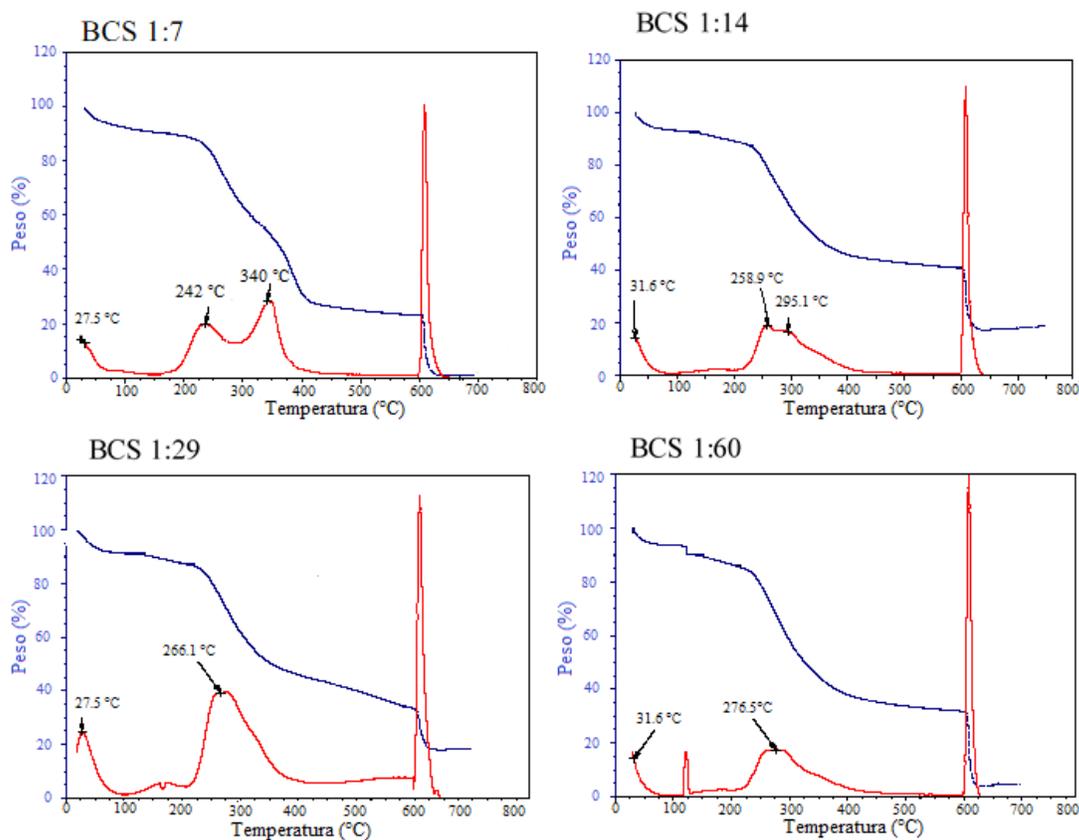


Figura 20. Termogramas de BCS sintetizados con diferente relación molar de Brij-SA:CS (1:7,1:14, 1:29, 1:60).

Los valores obtenidos de la temperatura de degradación del CS en las diferentes muestras de BCS fueron analizados para estudiar la dependencia de su comportamiento térmico con respecto a la cantidad de Brij-SA injertado.

En todos los casos, se observó una disminución en la temperatura de degradación conforme aumentó la cantidad de injerto de Brij-SA en la muestra. La muestra con mayor proporción de Brij-SA en relación con el CS presenta una diferencia de

alrededor de 50 °C (BCS 1:7, 242°C) en contraste con la temperatura de descomposición del CS puro (294.6 °C).

Dado que en todos los casos se observó la disminución en la temperatura de descomposición del CS al aumentar la proporción del Brij-SA en la muestra, se puede inferir que el injerto de Brij-SA reduce la estabilidad térmica del CS. (Fig. 21)

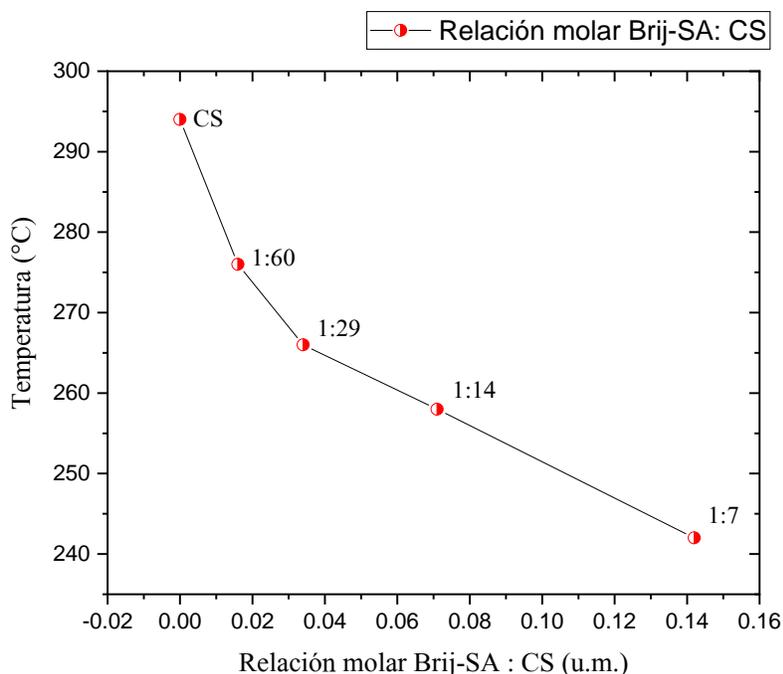


Figura 21. Estudio de la estabilidad térmica del CS en función de la relación molar Brij-SA:CS.

6.5 Concentración Micelar Crítica (CMC)

La CMC fue determinada apartir de soluciones con diferentes concentraciones de la muestra de BCS 1:7. Para ello, se realizaron análisis por tensión superficial, conductividad, densidad y pH. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 22.

El valor de la CMC fue dado por el punto de intercección en cada una de las graficas de conductividad, tensión superficial, densidad y pH *versus* la concentración del BCS 1:7.^{67,68} Para obtener dicho valor, se trazaron dos líneas de tendencia, cada una correspondiente a las dos regiones de comportamiento de cada grafica, la union de estas dos rectas se tomo como la CMC. En el caso de la grafica obtenida

mediante tensión superficial fue necesario utilizar el logaritmo de la concentración con la finalidad de observar la tendencia de la grafica de forma clara.

Se encontró que la CMC obtenida mediante tensión superficial fue de 0.102 (mg/mL), mientras que la CMC obtenida por conductividad y pH fue de 0.164 y 0.122 mg/mL respectivamente. Por otro lado, las mediciones obtenidas por densidad fueron descartadas debido a la ausencia del cambio abrupto en el comportamiento de la gráfica el cual es característico de la CMC

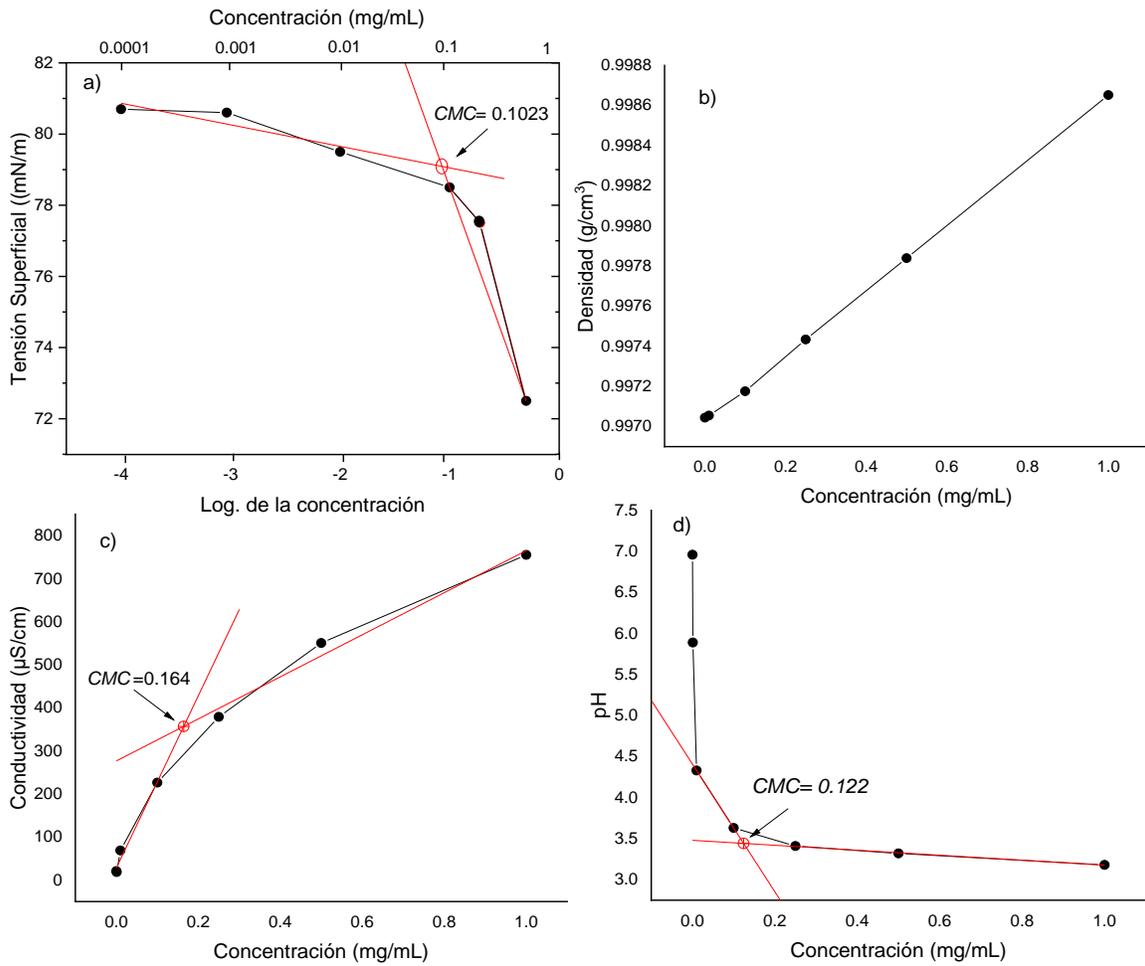


Figura 22. Curvas de (a) tensión superficial, (b) densidad, (c) conductividad eléctrica y (d) pH medidas a diferentes concentraciones de la muestra BCS (1:7).

Los cambios bruscos presentados en las propiedades de las muestras a partir de las concentraciones 0.100- 0.200 mg/mL sugieren la formación de micelas por parte de este compuesto. Por tanto, el intervalo de 0.100 – 0.200 mg/mL fue tomado como correspondiente a la CMC de este sistema.

En la tabla 6 se muestran los diversos valores reportados de la CMC para distintos sistemas de CS modificado, en la mayoría de los casos se observó que las micelas obtenidas presentaron forma esférica.

Tabla 6. CMC y morfología micelar de distintos sistemas basados en CS modificado.

Autor	Artículo	Muestras	CMC (mg/mL)	Forma micelar
Gergely Tóth et al. ⁶⁹	<i>"Structure of BRIJ 35 Nonionic Surfactant in Water: A Reverse Monte Carlo Study."</i>	Brij 35	0.10	Esférica con núcleo hidrofóbico.
Vasiljević et al. ⁷⁰	<i>"The Influence of a Surfactant's Structure and the Mode of its Action During Reactive Wool Dyeing"</i>	Brij S20 Brij S10 Brij S100 Brij 58	0.006 0.002 0.023 0.007	Esférica
Almeida et al. ⁷¹	<i>"Novel amphiphilic chitosan micelles as carriers for hydrophobic anticancer Drugs."</i>	CS injertado con polietilenglicol y ácido oleico. (PEG-CS-OA)	0.15 (DLS) 0.14 (Tensión superficial)	Esféricas
Libro ⁷²	<i>"Chitosan and its derivatives as self-assembled systems for drug delivery".</i>	CS-g-acido esterico CS-g-polietilenglicol CS- polivinilpirilidona Succinato de tocoferol glicol quitosano	0.14 0.007 0.83 0.002	-
Liang et al. ⁷³	<i>"Amphiphilic Polymeric Micelles Based on Deoxycholic Acid and Folic Acid Modified Chitosan for the Delivery of Paclitaxel".</i>	CS modificado con ácido desoxicólico y ácido fólico (FA-CS-DA)	0.006 (Fluorescencia)	Esférica
Pourjavadi et al. ⁷⁴	<i>"Synthesis of micelles based on chitosan functionalized with gold nanorods as a light sensitive drug delivery vehicle."</i>	CS modificado con (L-lactida), poli (N-isopropilacrilamida) y poli (acrilamida) (CS-PLA-PNIPAM-co-PAAm)	0.132 (Fluorescencia)	Esférica
Xiong et al. (Referencia) ⁴⁵	<i>"Brij-grafted-chitosan copolymers with function of P-glycoprotein modulation: Synthesis, characterization and in vitro investigations."</i>	CS injertado con Brij S20 diferente relación molar. BC3 BC12 BC20 BC55	0.37 0.24 0.24 0.11 (fluorescencia)	-
Esta tesis	<i>"Caracterización y modificación de quitosano con un surfactante del tipo no-iónico (brij 35)."</i>	CS injertado con Brij-SA relación molar 1:7 Brij-SA:CS	0.1023 (Tensión superficial) 0.1644 (Conductividad) 0.1241 (pH)	-

6.7 Pruebas preliminares de formación de microemulsiones empleando BCS

Para las pruebas preliminares primero se preparó la solución micelar de agua y BCS (1:3 y 1:7) conteniendo 8 mg de muestra por 1 mL de solución. Las muestras fueron preparadas a temperatura ambiente en agitación constante hasta formar una solución homogénea y cristalina. Posteriormente, la solución fue puesta en agitación a temperatura ambiente y se añadió gota a gota la fase oleosa (método por titulación). Durante la mezcla de los componentes (agua, aceite y BCS) se debe formar una mezcla cristalina con una sola macrofase para que la formación de la microemulsión se considere exitosa.

En el caso del sistema BCS 1:7 se tituló con aceite esencial de menta y aceite esencial de clavo; en ambos casos se observó cambio de fase y turbidez en la solución desde la primera gota añadida de aceite. Por otro lado, la solución con BCS 1:3 fue titulada únicamente con aceite esencial de menta. En primera instancia, se añadió una gota de aceite a la solución y no se presentó cambio de fase ni de color. Sin embargo, pasados los minutos se observó cambio de fase. De lo anterior, se puede concluir que la formación de las microemulsiones no fue posible debido, posiblemente, a la baja concentración de surfactante en los sistemas probados de BCS (1:3 y 1:7).

VII. CONCLUSIONES

- ✓ Se funcionalizó Brij 35 con SA para lograr su posterior injerto sobre una matriz polimérica de CS.
- ✓ Se obtuvieron materiales de CS modificado (BCS) con diferentes grados de injerto de Brij-SA, el cual incremento al aumentar la cantidad inicial de Brij-SA en el medio de reacción.
- ✓ Los análisis realizados mediante FT-IR, RMN de protón, XDR y TGA confirmaron la modificación del Brij 35 con SA así como la modificación del CS con Brij-SA.
- ✓ El injerto de Bri-SA en CS modificó la estructura cristalina y estabilidad térmica del CS.

✓ Se logró determinar la CMC de una muestra de BCS mediante tres métodos de medición diferentes sugiriendo la formación de micelas por parte de este compuesto por arriba de una concentración en el intervalo de 0.100 – 0.200 mg/mL.

✓ Se realizaron estudios preliminares de la formación de microemulsiones a partir de los materiales BCS_{1:3} y BCS_{1:7}. Los estudios preliminares no mostraron la formación de microemulsiones debido probablemente a la baja concentración de surfactante en el CS modificado.

TRABAJO A FUTURO

Se espera que la presente investigación contribuya a la futura preparación de microemulsiones biocompatibles a partir del uso de CS modificado con un surfactante. La preparación de este tipo de microemulsiones permitiría en un futuro poder encapsular fármacos hidrófobos o principios activos hidrófobos (por ejemplo, paclitaxel, curcumina) en la fase oleosa y de esta manera se podría potenciar su acción contra células cancerosas. En la Fig. 23 se muestra una representación esquemática de la metodología propuesta. Además, la presencia de CS podría regular y dirigir el mecanismo de liberación del fármaco debido a su capacidad de respuesta a cambios de pH. Se ha observado en estudios previos que la liberación de fármaco, en sistemas que contienen CS, se da preferentemente a condiciones de valores pH ligeramente inferiores (5.8-6.5) al pH fisiológico de la sangre (7.4), lo que permitiría que estos sistemas liberarán el fármaco en el ambiente ácido que presentan los tejidos cancerosos.

Además, tomando en cuenta los resultados preliminares de formación de microemulsiones, se considerará agregar directamente el fármaco a la solución micelar esperando que se incorpore dentro de la micela polimérica.

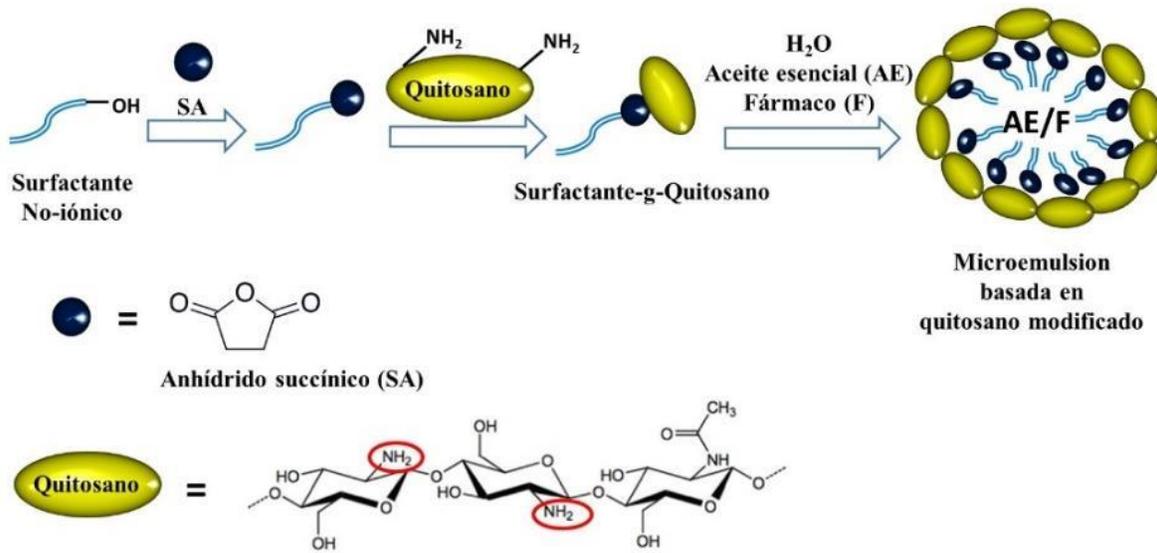


Figura 23. Representación esquemática de la estrategia planteada para la formación.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Langevin, D. Micelles and microemulsions. *Annu. Rev.* **415**, 341–369 (1992).
2. Lawrence, M. J. & Rees, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **45**, 89–121 (2000).
3. Mishra, A., Panola, R. & Rana, A. C. Microemulsions : As drug delivery system. *J. Sci. Innov. Res. Innov. Res.* **3**, 467–474 (2014).
4. Fanun, M. Microemulsions as delivery systems. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **17**, 306–313 (2012).
5. Kesan, K., Minyak, F., Terhadap, K. & Mikroemulsi, S. Study on the effect of oil phase and co-surfactant on microemulsion systems. *Malaysian J. Anal. Sci.* **21**, 1409–1416 (2017).
6. Carlucci, A. M., Vidal, M. C. & Bregni, C. Las Microemulsiones como Veh í culos para Administraci ó n de Drogas. *Acta Farm. Bonaer.* **23**, (2004).
7. Hui, Y. *et al.* Dual controlled release nanomicelle-in-nanofiber system for long-term antibacterial medical dressing. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **30**, 64–76 (2018).
8. Ge, X., Wei, M., He, S. & Yuan, W. Advances of Non-Ionic Surfactant Vesicles (Niosomes) and Their Application in Drug Delivery. *Pharmaceutics* **11**, 55 (2019).
9. Karasulu, H. Y. Microemulsions as novel drug carriers : the formation , stability , applications and toxicity. *Expert Opin. Drug Deliv.* **5**, 119–136 (2008).
10. Xin, C. *et al.* Stearic Acid-Grafted Chitooligosaccharide Nanomicelle System with Biocleavable Gadolinium Chelates as a Multifunctional Agent for Tumor Imaging and Drug Delivery. *Springer Sci.* **36**, (2018).
11. Xiaodan Qi, Xile Jia, Y. S. Preparation and Characterization of Florfenicol / Chitosan-stearic Acid Polymer Nanomicelle and Its Antibiotic Properties. *J. Wuhan Univ. Technol. Sci Ed* **33**, 1007–1013 (2018).
12. Hatamipour, M., Sahebkar, A., Alavizadeh, S. H., Dorri, M. & Jaafari, M. R. Novel nanomicelle formulation to enhance bioavailability and stability of curcuminoids. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **22**, 282–289 (2018).
13. Farhangi, M., Kobarfard, F., Mahboubi, A., Vatanara, A. & Mortazavi, S. A. Preparation of an optimized ciprofloxacin-loaded chitosan nanomicelle with enhanced antibacterial activity. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **44**, 1273–1284 (2018).
14. Crini, G. & Hatchett, C. Historical review on chitin and chitosan biopolymers. *Environ. Chem. Lett.* **17**, 1623–1643 (2019).
15. Brasselet, C. *et al.* Modification of Chitosan for the Generation of Functional Derivatives. *Arch. Ouvert. HAL* **9**, 0–33 (2019).
16. Jiang, T., James, R., Kumbar, S. G. & Laurencin, C. T. Chitosan as a Biomaterial. in *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* 91–113 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-396983-5.00005-3.
17. Ali, A. & Ahmed, S. International Journal of Biological Macromolecules A review on chitosan

- and its nanocomposites in drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **109**, 273–286 (2018).
18. Tiyaboonchai, W. Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery. *Naresuan Univ. J.* **11**, 51–66 (2003).
 19. Zhang, J. *et al.* Chitosan Modification and Pharmaceutical/Biomedical Applications. *Mar. Drugs* **8**, 1962–1987 (2010).
 20. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana. *Chapingo Ser. Hortic.* **15**, 307–317 (2009).
 21. Othman, N. *et al.* Synthesis and Optimization of Chitosan Nanoparticles Loaded with L-Ascorbic Acid and Thymoquinone. *Nanomaterials* **8**, 920 (2018).
 22. Othman, N. *et al.* Synthesis and optimization of chitosan nanoparticles loaded with l-ascorbic acid and thymoquinone. *Nanomaterials* **8**, (2018).
 23. Ramirez, C. *et al.* Determinación del grado de desacetilación de quitosana mediante titulación potenciométrica, FTIR y Raman. *Cim* **4**, 769–776 (2016).
 24. Park, J. K., Chung, M. J., Choi, H. N. & Park, Y. II. Effects of the Molecular Weight and the Degree of Deacetylation of Chitosan Oligosaccharides on Antitumor Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **3**, 266–277 (2011).
 25. Si, T., Thein-han, W. W. & Thi, N. Functional characteristics of shrimp chitosan and its membranes as affected by the degree of deacetylation. *Bioresour. Technol.* **97**, 659–663 (2006).
 26. Pellá, M. C. G., Lima-tenório, M. K. & Tenório-neto, E. T. Chitosan-based hydrogels : From preparation to biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* **196**, 233–245 (2018).
 27. Pantshwa, J. *et al.* Synthesis of novel amphiphilic poly(N-isopropylacrylamide)-b-poly(aspartic acid) nanomicelles for potential targeted chemotherapy in ovarian cancer. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **39**, 308–323 (2017).
 28. Mitra, S., Gaur, U., Ghosh, P. C. & Maitra, A. N. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran – doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J. Control. release* **74**, 317–323 (2001).
 29. Wang, Q., Zhang, N., Hu, X., Yang, J. & Du, Y. Chitosan/starch fibers and their properties for drug controlled release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **66**, 398–404 (2007).
 30. Celik, G. & Oksuz, A. U. Controlled release of ibuprofen from electrospun biocompatible nanofibers with in situ QCM measurements. *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.* **52**, 76–83 (2015).
 31. Motiei, M. & Kashanian, S. Novel amphiphilic chitosan nanocarriers for sustained oral delivery of hydrophobic drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* **99**, 285–291 (2017).
 32. Amirmahani, N., Mahmoodi, N. O., Mohammadi, M. & Ghavidast, A. Journal of Industrial and Engineering Chemistry Advances in nanomicelles for sustained drug delivery. *J. Ind. Eng. Chem.* **55**, 21–34 (2017).
 33. Santos, M. M. M. F. Q. L. C. C. Selective Modification of Chitin and Chitosan: on the route to

- tailored oligosac- charides Authors: *Asian Chem. J.* **11**, 3468–3481 (2016).
34. Kurita, K. Chemical Modifications of Chitin and Chitosan. in *Chitin in Nature and Technology*. (ed. In: Muzzarelli R., Jeuniaux C., G. G. W. (eds) 287–293 (Springer International Publishing, 1986). doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2167-5_37.
 35. Brasselet, C. *et al.* Modification of chitosan for the generation of functional derivatives. *Appl. Sci.* **9**, 0–33 (2019).
 36. Bashir, S., Teo, Y. Y., Ramesh, S., Ramesh, K. & Khan, A. A. Properties and biomedical applications : a state of the art review. *Rev. Chem. Eng.* **31**, 563–597 (2015).
 37. Zhang, C. Synthesis and characterization of water-soluble. *Eur. Polym. J.* **39**, 1629–1634 (2003).
 38. Martins, A. F. *et al.* Preparation and cytotoxicity of N,N,N-trimethyl chitosan/alginate beads containing gold nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* **72**, 466–471 (2015).
 39. Subbiah, R. *et al.* N , N , N -Trimethyl chitosan nanoparticles for controlled intranasal delivery of HBV surface antigen. *Carbohydr. Polym.* **89**, 1289–1297 (2012).
 40. Pires, N. R. *et al.* Sulfated chitosan as tear substitute with no antimicrobial activity. *Carbohydr. Polym.* **91**, 92–99 (2013).
 41. Knidri, H. El, Belaabed, R., Addaou, A., Laajeb, A. & Lahsini, A. International Journal of Biological Macromolecules Extraction , chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* **120**, 1181–1189 (2018).
 42. Baldino, L., Concilio, S., Cardea, S., De Marco, I. & Reverchon, E. Complete glutaraldehyde elimination during chitosan hydrogel drying by SC-CO₂ processing. *J. Supercrit. Fluids* **103**, 70–76 (2015).
 43. Molatlhegi, O. & Alagha, L. Adsorption characteristics of chitosan grafted copolymer on kaolin. *Appl. Clay Sci.* **150**, 342–353 (2017).
 44. Woraphatphadung, T. *et al.* Development of Chitosan-Based pH-Sensitive Polymeric Micelles Containing Curcumin for Colon-Targeted Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech* **19**, 991–1000 (2018).
 45. Xiong, W. *et al.* Brij-grafted-chitosan copolymers with function of P -glycoprotein modulation : Synthesis , characterization and in vitro investigations. *Carbohydr. Polym.* **204**, 89–96 (2019).
 46. Liu, G., Li, K. & Wang, H. Polymeric micelles based on PEGylated chitosan-g-lipoic acid as carrier for efficient intracellular drug delivery. *J. Biomater. Appl.* **31**, 1039–1048 (2017).
 47. Liang, N. *et al.* Polymeric micelles based on modified glycol chitosan for paclitaxel delivery: Preparation, characterization and evaluation. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–14 (2018).
 48. Bano, S., Afzal, M., Waraich, M. M., Alamgir, K. & Nazir, S. Paclitaxel loaded magnetic nanocomposites with folate modified chitosan/carboxymethyl surface; a vehicle for imaging and targeted drug delivery. *Int. J. Pharm.* **513**, 554–563 (2016).
 49. Fanun, M. Current Opinion in Colloid & Interface Science Microemulsions as delivery

- systems. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **17**, 306–313 (2012).
50. Ge, W. *et al.* Characterization and antioxidant activity of β -carotene loaded chitosan-graft-poly (lactide) nanomicelles. *Carbohydr. Polym.* **117**, 169–176 (2015).
 51. Motiei, M., Kashanian, S., Lucia, L. A. & Khazaei, M. Intrinsic parameters for the synthesis and tuned properties of amphiphilic chitosan drug delivery nanocarriers. *J. Control. Release* **260**, 213–225 (2017).
 52. Chen, T. *et al.* Multi-functional chitosan polymeric micelles as oral paclitaxel delivery systems for enhanced bioavailability and anti-tumor efficacy. *Int. J. Pharm.* **578**, (2020).
 53. Zhu, H. *et al.* Folate-modified chitosan micelles with enhanced tumor targeting evaluated by near infrared imaging system. *Carbohydr. Polym.* **86**, 1118–1129 (2011).
 54. Gao, Y., Li, G., Zhou, Z., Gao, L. & Tao, Q. Sensitive complex micelles based on host-guest recognition from chitosan-graft- β -cyclodextrin for drug release. *Int. J. Biol. Macromol.* **105**, 74–80 (2017).
 55. Almeida, A., Silva, D., Gonçalves, V. & Sarmento, B. Synthesis and characterization of chitosan-grafted-polycaprolactone micelles for modulate intestinal paclitaxel delivery. *Drug Deliv. Transl. Res.* **8**, 387–397 (2018).
 56. Woraphatphadung, T. *et al.* PH-Responsive polymeric micelles based on amphiphilic chitosan derivatives: Effect of hydrophobic cores on oral meloxicam delivery. *Int. J. Pharm.* **497**, 150–160 (2016).
 57. Sukamporn, P. *et al.* Self-assembled nanomicelles of damnacanth-loaded amphiphilic modified chitosan: Preparation, characterization and cytotoxicity study. *Mater. Sci. Eng. C* **77**, 1068–1077 (2017).
 58. Mahmoodzadeh, F., Jannat, B. & Ghorbani, M. International Journal of Biological Macromolecules Chitosan-based nanomicelle as a novel platform for targeted delivery of methotrexate. *Int. J. Biol. Macromol.* **126**, 517–524 (2019).
 59. Hsu, C. W. *et al.* pH-responsive polymeric micelles self-assembled from benzoic-imine-containing alkyl-modified PEGylated chitosan for delivery of amphiphilic drugs. *Int. J. Biol. Macromol.* **163**, 1106–1116 (2020).
 60. Zhang, H. *et al.* Directly determining the molecular weight of chitosan with atomic force microscopy. *Front. Nanosci. Nanotechnol.* **2**, 123–127 (2016).
 61. Pestov, A. V. *et al.* Imidazolyl derivative of chitosan with high substitution degree: Synthesis, characterization and sorption properties. *Carbohydr. Polym.* **138**, 309–316 (2016).
 62. Czechowska-biskup, R., Jarosińska, D., Rokita, B., Ulański, P. & Rosiak, J. M. Determination of degree of deacetylation of chitosan-comparision of methods. *Prog. Chem. Appl. Chitin its Deriv.* **12**, 5–20 (2012).
 63. Jiang, Y. Determination of the Deacetylation Degree of Chitooligosaccharides. *Mar Drugs.* **15**, 1–14 (2017).
 64. Yao, J., Hou, L., Zhou, J. P., Zhang, Z. Q. & Sun, L. Preparation of lorazepam-loaded

- microemulsions for intranasal delivery and its pharmacokinetics. *Pharmazie* **64**, 642–647 (2009).
65. La, M. *et al.* A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**, 1149–1158 (2003).
 66. Hirai, A., Odani, H. & Nakajima, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy. *Polym. Bull.* **26**, 87–94 (1991).
 67. Takassi, M. A., Hashemi, A., Rostami, A. & Zadehnazari, A. A lysine amino acid-based surfactant: Application in enhanced oil recovery. *Pet. Sci. Technol.* **34**, 1521–1526 (2016).
 68. Wu, Z., Cai, M., Cao, J., Zhang, J. & Luo, X. Effects of copolymer component on the properties of phosphorylcholine micelles. *Int. J. Nanomedicine* **12**, 487–500 (2017).
 69. Tóth, G. & Madarász, Á. Structure of BRIJ-35 Nonionic Surfactant in Water: A Reverse Monte Carlo Study. *Langmuir* **22**, 590–597 (2006).
 70. *et al.* The Influence of a Surfactant's Structure and the Mode of its Action During Reactive Wool Dyeing. *Tekstilec* **58**, 301–313 (2015).
 71. Almeida, A. *et al.* Novel amphiphilic chitosan micelles as carriers for hydrophobic anticancer drugs. *Mater. Sci. Eng. C* **112**, 110920 (2020).
 72. Outline, C. *Chitosan and its derivatives as self-assembled systems for drug delivery. Controlled Drug Delivery* (2015). doi:10.1016/b978-1-907568-45-9.00003-2.
 73. Li, L. *et al.* Amphiphilic polymeric micelles based on deoxycholic acid and folic acid modified chitosan for the delivery of paclitaxel. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
 74. Pourjavadi, A., Bagherifard, M. & Doroudian, M. Synthesis of micelles based on chitosan functionalized with gold nanorods as a light sensitive drug delivery vehicle. *Int. J. Biol. Macromol.* **149**, 809–818 (2020).
 75. Xiong, W. *et al.* Brij-grafted-chitosan copolymers with function of P-glycoprotein modulation: Synthesis, characterization and in vitro investigations. *Carbohydr. Polym.* **204**, 89–96 (2019).