

EFECTO DEL ÉSTER DEL ÁCIDO CÍTRICO Y GENIPINA COMO AGENTE DE ENTRECruzAMIENTO EN EL NANOCOMPÓSITO QUITOSANO/POLIALCOHOL VINÍLICO/MONTMORILLONITA

Jerónimo Rodríguez Becerra (1), Ma. Elena Calixto Olalde (2)

1 [Ingeniería en Materiales, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [jero.rodriguez@hotmail.com]

2 [Departamento de Ingeniería en Materiales, Campus Irapuato, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [macalixto@itesi.edu.mx]

Resumen

El quitosano es un biopolímero con aplicaciones diversas, una de ellas es la eliminación de metales pesados en agua contaminada; sin embargo, su estabilidad dimensional en dicho medio es muy limitada, por lo que debe ser entrecruzado. El presente proyecto analiza el efecto que tiene el éster de ácido cítrico y la genipina en el entrecruzamiento del quitosano, para lo cual se sintetizaron esferas de este polímero y se evaluó su capacidad de hinchamiento, la cual aumentó en ambos casos a medida que disminuyó el pH del medio acuoso, debido a la protonación de los grupos amino del quitosano, lo que promueve una mayor difusión de agua para solvatar las cargas. Los espectros obtenidos por FT-IR muestran las bandas características de la reacción de entrecruzamiento del quitosano con genipina y éster de ácido cítrico, comprobando una adecuada reticulación del material. El porcentaje de entrecruzamiento que se alcanzó con la genipina fue del 32.89 y para el éster de ácido cítrico fue del 80.06.

Abstract

Chitosan is a biopolymer with several applications, and one is the elimination of heavy metals in contaminated water; however, its dimensional stability in this medium it is not enough, and it has to be cross-linked. This project analyzes the effect of the ester of citric acid and genipin in the cross-linking of chitosan; spheres of this polymer were synthesized and it was evaluated their swelling capacity, which one increased with both cross-linking agents when pH of water decreased, because the protonation of the amine groups of chitosan, occasioning a better diffusion of water to equalize the charges. The spectrums obtained in FT-IR show the peaks of the cross-linking reaction of chitosan with genipin and ester of citric acid, proving a good reticulation of the material. The percentage of cross-linking with genipin was 32.89 and for ester of citric acid was 80.06.

Palabras Clave

Razón de hinchamiento, grado de entrecruzamiento, grupos amino libres, espectroscopia infrarroja, espectroscopía UV-Vis

INTRODUCCIÓN

El quitosano es un biopolímero natural; una de sus aplicaciones es la eliminación de metales en agua contaminada; sin embargo, debido a su baja estabilidad dimensional en este medio, se entrecruza para evitar su disgregación. El glutaraldehído ha sido el agente más empleado para este propósito, pero por su alta toxicidad se han buscado alternativas más amigables con el medio ambiente, tales como el éster del ácido cítrico y la genipina, que reticulan al quitosano formando enlaces a través de los grupos amino de las cadenas poliméricas. La efectividad de estos materiales en la remoción de metales depende de dos factores: su estabilidad dimensional y la cantidad de grupos amino libres, por lo que el grado de entrecruzamiento debe ser óptimo, de manera que se evite la disgregación del material, y que a la vez permanezca la mayor cantidad posible de grupos amino disponibles, ya que son estos los encargados de retener a los iones metálicos. A su vez, la incorporación de montmorillonita y polialcohol vinílico también provee una mayor estabilidad dimensional al material.

En 2005, Varshosaz y Alinagari encontraron que el quitosano entrecruzado con ácido cítrico mantiene su estabilidad a valores de pH de hasta 2 [1]. Por su parte, en 2007, Yuan *et al.* analizaron el efecto de la genipina al reticular quitosano, encontrando que la razón de hinchamiento disminuye a mayor tiempo de entrecruzamiento, el cual presenta su valor más óptimo a 4 horas de reacción [2].

En el presente proyecto se ha sintetizado el nanocompuesto quitosano/polialcohol vinílico/montmorillonita, el cual se ha entrecruzado con agentes naturales como son la genipina y éster de ácido cítrico, lo que reduce la toxicidad con respecto a otras sustancias como el glutaraldehído. Las caracterizaciones llevadas a cabo hasta el momento incluyen pruebas de hinchamiento a diferentes pH (para analizar su capacidad de adsorción de agua), obtención de sus espectros de infrarrojo (para corroborar que efectivamente el quitosano se ha entrecruzado), así como el uso de la espectroscopía UV-Vis para determinar la cantidad de grupos amino disponibles después del entrecruzamiento, los cuales serán los responsables de retener a los

iones metálicos cuando se analice la eficiencia del nanocompuesto en este ámbito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Quitosano con un 88% de grado de desacetilación y un peso molecular de 78000 g/mol, polialcohol vinílico con un 99% grado de hidrólisis, montmorillonita, ácido acético, genipina, ácido cítrico, etanol, KBr, NaOH, SnCl₂·2H₂O, ninhidrina, etilen glicol monometil éter, glicina, isopropanol.

Síntesis y entrecruzamiento de las perlas

Se preparó una solución de polímero al 2% w/v (del polímero total: 90% wt QT-10% wt PVA), con MMT 1% w/v, empleando ácido acético 2% v/v; la cual se goteó en NaOH 1.5 M para formar las perlas por coaservación, las cuales se lavaron y se entrecruzaron con genipina (por cada 0.28 g de quitosano se agregó 40 ml de solución 1 mM) y ácido cítrico (por cada 8x10⁻³ moles de quitosano se agregó 1 mol de ácido cítrico, así como 50 ml de etanol por cada 0.1 g de agente de entrecruzamiento para formar el éster de ácido cítrico). En ambos casos, las condiciones fueron 4 horas de reacción y 300 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente, el PVA fue entrecruzado por medio de criogelación, para lo cual las perlas se sometieron a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento, con una duración de 12 horas en cada una de las dos etapas. Previo a su caracterización, las perlas fueron liofilizadas.

Análisis de la razón de hinchamiento

Se determinó la capacidad de adsorción de agua de los materiales entrecruzados a tres diferentes valores de pH (6, 4 y 2), para lo cual las perlas se colocaban en agua y se medía su peso húmedo a cada minuto. La fórmula empleada es la siguiente:

$$E_{sw} = [(W_{sw} - W_0) / W_0] \times 100;$$

donde E_{sw} es la razón de hinchamiento de la perla, W_0 es el peso de la esfera liofilizada y W_{sw} es el peso de la esfera húmeda a un tiempo cualquiera. La razón de hinchamiento se obtuvo por triplicado para cada agente de entrecruzamiento en los tres diferentes valores de pH.

Determinación del grado de entrecruzamiento

El grado de entrecruzamiento de las perlas se determinó con un ensayo de ninhidrina. La solución ninhidrina se preparó como sigue: Solución A: 0.21 g de ácido cítrico, 2 ml de NaOH 1Mm y 0.008 g de $SnCl_2 \cdot 2H_2O$; Solución B: 0.2 g de ninhidrina en 5 ml de etilen glicol monometil éter. Ambas soluciones se mezclaron y agitaron durante 45 minutos. Para el ensayo, se pesó 1.5 mg de cada muestra liofilizada y se colocaron en 1 ml de solución de ninhidrina y 1 ml de agua destilada, calentándose en baño de agua a $100^\circ C$ durante 20 minutos. La solución se enfrió hasta temperatura ambiente y se agregó 5 ml de isopropanol al 50%, y se midió su absorbancia óptica con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 850 a 570 nm. El porcentaje de grupos amino libres en cada muestra entrecruzada es proporcional a la absorbancia óptica de la solución [1]. La concentración de dichos grupos se obtuvo por medio de una curva estándar de concentración de glicina – absorbancia, la cual se preparó previamente. La concentración medida se divide entre el peso de la muestra, y se multiplica por el peso molecular de la misma para obtener la fracción molar de grupos amino en la muestra. El grado de entrecruzamiento se determinó por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de entrecruzamiento} = \frac{[(NHN \text{ reactive amine})_{fresh} - (NHN \text{ reactive amine})_{fixed}] / (NHN \text{ reactive amine})_{fresh} \times 100}{1}$$

donde “fresh” corresponde a la fracción molar de grupos amino libres en una muestra sin entrecruzar y “fixed” es la fracción molar de grupos amino libres presentes en una muestra que ha sido entrecruzada.

Obtención del espectro FT-IT

Para obtener el espectro de infrarrojo de las muestra, estas fueron molidas y mezcladas con KBr para formar una pastilla, la cual fue llevada a un espectrofotómetro FT-IR Spectrum RX I donde se hizo un barrido en el rango de $400-4000 \text{ cm}^{-1}$; previamente se corrió un barrido de una pastilla de KBr que sirvió como fondo para la caracterización del nanocompuesto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Razón de hinchamiento

A continuación se muestra la razón de hinchamiento de los nanocompuestos entrecruzados con genipina y éster de ácido cítrico a tres diferentes valores de pH.

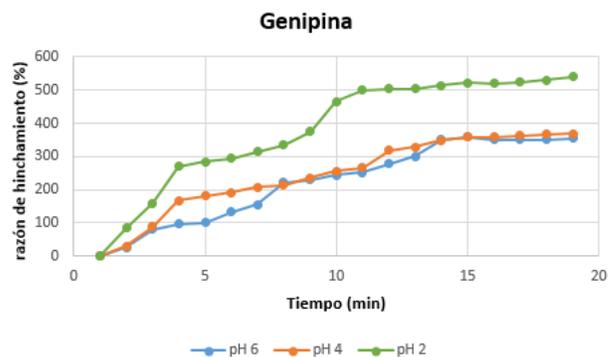


IMAGEN 1: Razón de hinchamiento a tres diferentes pH, de las esferas entrecruzadas con genipina.

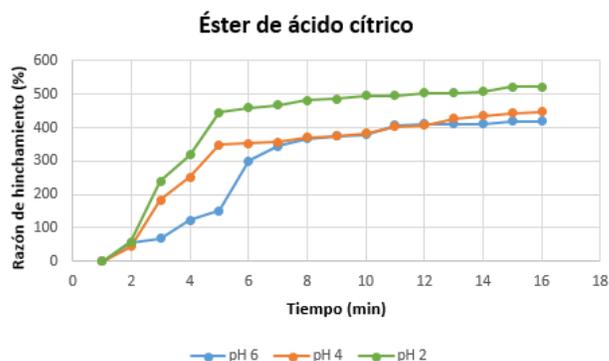


IMAGEN 2: Razón de hinchamiento a tres diferentes pH, de las esferas entrecruzadas con éster de ácido cítrico.

Como se puede observar, en ambos casos la razón de hinchamiento se incrementa a medida que disminuye el valor del pH del agua en que se realizaron las pruebas; esto se debe a que a valores de pH más ácidos se protonan los grupos amino del quitosano y esto origina una mayor difusión de agua para solvatar las cargas [3]. Además, en el caso del éster de ácido cítrico, este favorece una mayor adsorción de agua en comparación con la genipina, debido a la presencia de una cantidad más elevada de grupos hidrofílicos en la estructura del éster, además de que el entrecruzamiento con genipina colapsó las perlas, lo que ocasionó que la difusión de agua fuera menor.



IMAGEN 3: Esferas de QT/PVA/MMT entrecruzadas con éster de ácido cítrico y por criogelación durante la realización de las pruebas de hinchamiento.



IMAGEN 4: Esferas liofilizadas de QT/PVA/MMT entrecruzadas con genipina y por criogelación, previo a ser molidas para la obtención de su espectro FT-IR.

Grado de entrecruzamiento

Se observó que las perlas adquirieron un color café-azul después del entrecruzamiento con genipina, mientras que al emplear el éster de ácido cítrico, estas mantuvieron su tonalidad blanca.

El grado de entrecruzamiento obtenido fue de 32.89% para la genipina y 80.06% para el éster de ácido cítrico. De acuerdo a los resultados obtenidos, se demostró que la concentración de genipina empleada durante el entrecruzamiento es la adecuada, debido a que las perlas mantienen su estabilidad dimensional en medio ácido, además de que se mantiene una elevada cantidad de grupos amino disponibles en el material. Por su parte, la concentración de éster de ácido cítrico debe ser reducida, ya que las perlas también mantienen su estabilidad dimensional, pero la cantidad de grupos amino disponibles en el material se reduce.

Espectro FT-IR

A continuación se muestra el espectro FT-IR de las esferas entrecruzadas con genipina y éster de ácido cítrico.

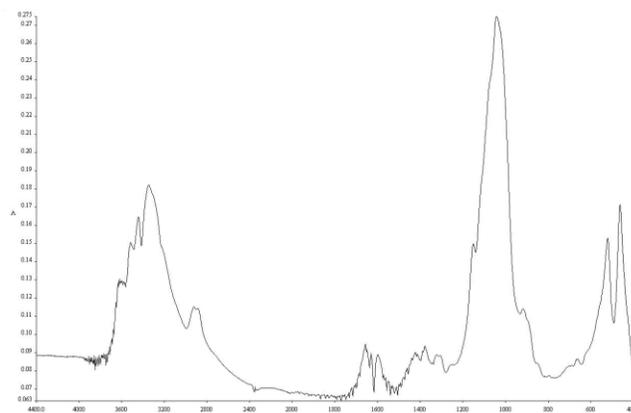


IMAGEN 5: Espectro FT-IR de las esferas QT/PVA/MMT entrecruzadas con genipina.

Cuando el quitosano se entrecruza con genipina, ocurren cambios conformacionales como resultado de un reacomodo de las cadenas para formar enlaces covalentes [4]. La banda correspondiente al enlace C=O en 1665 cm^{-1} se ensanchó a causa

de la superposición con la banda del enlace C=C en 1628 cm^{-1} de la estructura de la genipina.

El grupo amino del quitosano reacciona con la genipina para formar un enlace amido y amino heterocíclico. La banda recién formada a 1566 cm^{-1} debe mostrarse superpuesta también con el pico del grupo amido I del quitosano, lo que la ensancha aún más. El pico que apareció a 1415 cm^{-1} después del entrecruzamiento muestra la presencia de un estiramiento del anillo de la amina heterocíclica. Además, el pico correspondiente al estiramiento C-N en la amida III, que aparece a 1233 cm^{-1} en el quitosano, se recorrió a aproximadamente 1260 cm^{-1} después de reticulamiento. Por último el pico en 1740 cm^{-1} correspondiente al grupo carboxílico del quitosano, desapareció al entrecruzar con genipina.

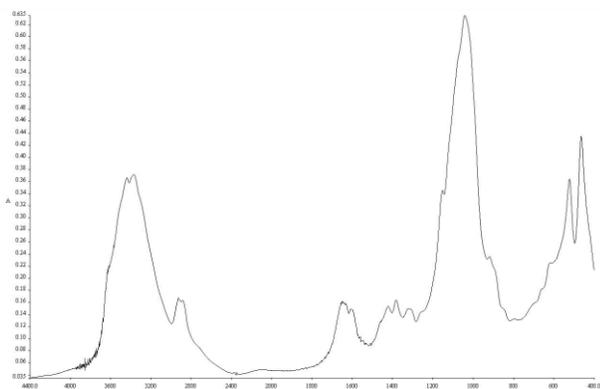


IMAGEN 5: Espectro FT-IR de las esferas QT/PVA/MMT entrecruzadas con éster de ácido cítrico.

En el entrecruzamiento con éster de ácido cítrico, la banda en 1593 cm^{-1} correspondiente al grupo amino disminuyó su intensidad, mientras que a 3400 cm^{-1} aparece una intensa señal correspondiente al grupo amido que se forma a través de la reacción del grupo amino del quitosano y del éster del ácido cítrico.

CONCLUSIONES

Valores de pH más bajos incrementan la razón de hinchamiento de las esferas, a causa de la protonación de los grupos amino del quitosano, lo que favorece una mayor difusión de agua para solvatar las cargas.

El espectro FT-IR comprueba el entrecruzamiento del quitosano empleando genipina y éster de ácido, al mostrarse el desplazamiento, aparición y desaparición de bandas características de esta reacción.

La concentración de genipina empleada en el entrecruzamiento fue la adecuada, ya que las perlas mantienen su estabilidad dimensional en medio ácido, así como una elevada cantidad de grupos amino disponibles. Por su parte, se debe reajustar la concentración de ácido cítrico, ya que su grado de entrecruzamiento fue muy elevado.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato por el apoyo económico brindado para la realización de este proyecto. Acuerdo 05-02EX-14 folio 14-DPP-Q182-26

REFERENCIAS

- [1] Varshosaz, J. & Alinagari, R. (2005). Effect of Citric Acid as Cross-linking Agent on Insulin Loaded Chitosan Microspheres. *Iranian Polymer Journal*, 14(7), pp. 647-656.
- [2] Yuan, Y., Chesnutt, B. M., Utturkar, G., Haggard, W. O., Yang, Y., Ong, J. L. & Bumgardner, J. D. (2007). The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. *Carbohydrate Polymers*, 68, pp. 561-567. doi: 10.1016/j.carbpol.2006.10.023
- [3] Ruíz, E., Agudelo, J., Katime, I. A. & Valderruten, N. E. (2012). Síntesis y caracterización de hidrogeles interpenetrados de quitosano/PNIPA. V Jornada de Socialización de la Investigación en Icesi.
- [4] Mirzaei, E., Faridi-Majidi, R., Shokrgozar, M. A. & Paskiabi, F. A. (2014). Genipin cross-linked electrospun chitosan-based nanofibrous mat as tissue engineering scaffold. *Nanomedicine Journal*, 1(3), pp. 137-146.