

**ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DEL LARVICIDA  
NOVALURON A PARTIR DE UNA MATRIZ POLIMÉRICA DE  
QUITOSANO.**

**KATHERINE ESCOBAR ARAGÓN**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS  
SANTIAGO DE CALI**

**2017**

**ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DEL LARVICIDA  
NOVALURON A PARTIR DE UNA MATRIZ POLIMÉRICA DE QUITOSANO.**

**KATHERINE ESCOBAR ARAGÓN**

**Proyecto de grado para optar por el título de pregrado en Química  
Farmacéutica**

**Tutoras: Nora Elena Valderruten Posso, Ph.D**

**Clara Beatriz Ocampo, Ph.D**

**UNIVERSIDAD ICESI**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

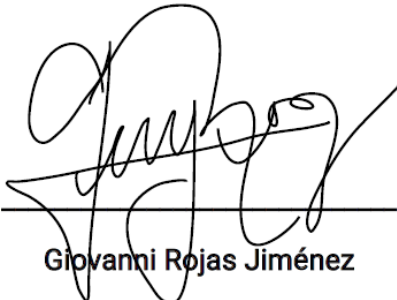
**PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**SANTIAGO DE CALI**

**2017**

**APROBADO POR**



Giovanni Rojas Jiménez

**Evaluador**

*Nora E. Valderruten*

**Nora Elena Valderruten Posso**

**Director de grado**

*Clara B. Ocampo Durán*

**Clara Beatriz Ocampo Durán**

**Co-director del proyecto de**

**Santiago de Cali**

**Viernes 07 de Noviembre del 2017**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primera medida, agradezco a Dios por cada una de las bendiciones que me ha regalado. Seguido a mis padres, Mamá y Papá gracias por su apoyo incondicional, por cada uno de sus consejos, por siempre tener una voz de aliento para mí, esto logro es de ustedes y para ustedes. Gracias a mi tutora Nora Elena Valderruten por su apoyo, su paciencia y compromiso en este proyecto. A mis compañeros de laboratorio y amigos por su apoyo incondicional, motivación y por hacer proceso mucho más ameno.

## TABLA DE CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| LISTA DE TABLAS .....   | 7  |
| LISTA DE GRÁFICAS.....  | 8  |
| LISTA DE FIGURAS .....  | 9  |
| TABLA DE ANEXOS.....  | 10 |
| RESUMEN DEL PROYECTO .....  | 11 |
| ABSTRACT.....   | 12 |
| 1. INTRODUCCIÓN.....  | 13 |
| 2. DESCRIPCION DEL PROYECTO.....  | 15 |
| 2.1 Planteamiento de la pregunta problema y justificación. ....   | 15 |
| 2.2 Marco teórico y estado del arte .....   | 16 |
| 2.3 Objetivos .....   | 23 |
| 2.3.1 Objetivo general.....   | 23 |
| 2.3.2 Objetivos específicos .....   | 23 |
| 2.4 Metodología.....  | 24 |
| 2.4.1 Reactivos, materiales y equipos empleados.....  | 24 |
| 2.4.2 Síntesis de hidrogeles de quitosano con dos grados de<br>entrecruzamiento y cargados con dos concentraciones diferentes de<br>Novaluron. .... | 24 |
| 2.4.3 Liberación del larvicida Novaluron desde matrices poliméricas de<br>quitosano. ....   | 26 |
| 2.4.4 Cuantificación de la concentración de Novaluron liberado desde las<br>matrices poliméricas de quitosano.....                                  | 27 |
| 2.4.5 Tiempo de equilibrio.....   | 28 |
| 2.4.6 Uniformidad de contenido .....  | 28 |
| 2.5 Resultados .....  | 32 |
| 2.5.1 Síntesis de hidrogeles de quitosano. ....   | 32 |
| 2.5.2 Determinación de la cinética de liberación del larvicida Novaluron a<br>partir de una matriz polimérica de quitosano. ....                    | 33 |
| 2.5.3 Ajuste al modelo cinético. ....   | 34 |
| 2.5.4 Análisis estadístico. ....  | 36 |
| 2.5.5 Tiempo de equilibrio.....   | 38 |
| 2.5.6 Uniformidad de dosis .....  | 39 |
| 2.5.7 Análisis térmicos.....  | 40 |
| 2.6 Discusión.....  | 49 |
| 2.6.1 Síntesis de hidrogeles de quitosano. ....   | 49 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.6.4 Uniformidad del contenido .....                 | 51        |
| 2.6.5 Calorimetría de barrido diferencial (DSC) ..... | 52        |
| 2.6.6 Análisis termogravimétrico .....                | 52        |
| 2.7 Conclusiones .....                                | 54        |
| 2.8 Recomendaciones .....                             | 55        |
| 2.9 Referencias .....                                 | 56        |
| <b>ANEXOS</b> .....                                   | <b>62</b> |

## LISTA DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Ecuaciones de los modelos cinéticos. ....                                 | 18 |
| <b>Tabla 2.</b> Reactivos empleados para la síntesis de hidrogeles de Quitosano.<br>..... | 24 |
| <b>Tabla 3.</b> Equipos de laboratorio.....   | 24 |
| <b>Tabla 4.</b> Coeficientes de correlación para cada modelo cinético.....                | 36 |
| <b>Tabla 5.</b> Análisis de varianzas.....  | 37 |
| <b>Tabla 6.</b> Datos de prueba de uniformidad de contenido. ....                         | 39 |
| <b>Tabla 7.</b> Datos obtenidos en el barrido de TGA .....                                | 48 |
| <b>Tabla 8.</b> Moles de glutaraldehído según porcentaje de entrecruzamiento ....         | 63 |
| <b>Tabla 9.</b> Volumen de glutaraldehído según porcentaje de entrecruzamiento.           | 64 |
| <b>Tabla 10.</b> Volumen de larvicida según la concentración requerida. ....              | 65 |

## LISTA DE GRÁFICAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Gráfica 1.</b> Curva de calibración del estándar Novaluron .....  | 33 |
| <b>Gráfica 2.</b> Cinética de liberación del larvicida Novaluron .....   | 34 |
| <b>Gráfica 3.</b> Ajuste al modelo cinético orden cero para hidrogeles con 50X y 25% de entrecruzamiento ( $r^2= 0,8898$ ).....  | 34 |
| <b>Gráfica 4.</b> Ajuste al modelo cinético orden cero para hidrogeles con 100X y 25% de entrecruzamiento ( $r^2= 0,9128$ )..... | 35 |
| <b>Gráfica 5.</b> Ajuste al modelo cinético orden cero para hidrogeles con 50X y 75% de entrecruzamiento ( $r^2= 0,9314$ ).....  | 35 |
| <b>Gráfica 6.</b> Ajuste al modelo cinético orden cero para hidrogeles con 100X y 75% de entrecruzamiento ( $r^2=0,9227$ ).....  | 35 |
| <b>Gráfica 7.</b> Gráficas factoriales de efectos principales. ....  | 38 |
| <b>Gráfica 8.</b> Gráfica factorial de interacciones. ....   | 38 |
| <b>Gráfica 9.</b> Tiempo de equilibrio .....   | 39 |



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Ciclo de vida del insecto <i>Aedes aegypti</i> .....  | 16 |
| <b>Figura 2.</b> Estructura química del quitosano.....   | 19 |
| <b>Figura 3.</b> Estructura química del larvicida Novaluron.....   | 20 |
| <b>Figura 4.</b> Estructura química de la Bifentrina.....  | 21 |
| <b>Figura 5.</b> Molde con hidrogeles de Quitosano.....  |    |
| <b>Figura 6.</b> Hidrogeles de Quitosano en proceso de secado.....   | 26 |
| <b>Figura 7.</b> Diseño de experimentos empleado para el estudio de la cinética.....   | 27 |
| <b>Figura 8.</b> Muestras de hidrogeles de quitosano, en incubadora de agitación, Shaker.....  | 27 |
| <b>Figura 9.</b> Espectrofotómetro Shimadzu.....   | 28 |
| <b>Figura 10.</b> Termograma del Hidrogel de quitosano con un 25% de entrecruzamiento.....   | 40 |
| <b>Figura 11.</b> Termograma del hidrogel de quitosano con un 75% de entrecruzamiento.....   | 40 |
| <b>Figura 12.</b> Termograma del hidrogel de quitosano con un 25% de entrecruzamiento y cargado con Novaluron.....   | 41 |
| <b>Figura 13.</b> Termograma del hidrogel quitosano con un 25% de entrecruzamiento y cargados con 5X de Novaluron.....                                       | 41 |
| <b>Figura 14.</b> Termograma del hidrogel de quitosano con un 75% de entrecruzamiento y cargados con 5X de Novaluron.....                                    | 42 |
| <b>Figura 15.</b> Termograma del hidrogel de quitosano con un 75% de entrecruzamiento y cargados con 10X de Novaluron.....                                   | 42 |
| <b>Figura 16.</b> Termograma del hidrogel de quitosano con uno 25% de entrecruzamiento y cargado con 5X de Piriproxifen.....                                 | 43 |
| <b>Figura 17.</b> Termograma del hidrogel de quitosano con uno 25% de entrecruzamiento y cargado con 10X de Piriproxifen.....                                | 43 |
| <b>Figura 18.</b> Termograma del hidrogel de quitosano con un 75% de entrecruzamiento y cargados con 5X de Piroproxifen.....                                 | 44 |
| <b>Figura 19.</b> Termograma del hidrogel de quitosano con un 75% de entrecruzamiento y cargados con 10X de Piroproxifen.....                                | 44 |
| <b>Figura 20. a)</b> Termograma de TGA para hidrogel de quitosano con un 25% de entrecruzamiento <b>b)</b> primera derivada.....                             | 45 |
| <b>Figura 21. a)</b> Termograma de TGA para hidrogel de quitosano con un 75% de entrecruzamiento. <b>b)</b> Primera derivada.....                            | 45 |
| <b>Figura 22. a)</b> Termograma de TGA para hidrogel de quitosano con un 25% de entrecruzamiento y cargado con Novaluron. <b>b)</b> primera derivada.....    | 46 |
| <b>Figura 23. a)</b> Termograma de TGA para hidrogel de quitosano con un 75% de entrecruzamiento y cargado con Novaluron. <b>b)</b> primera derivada.....    | 46 |
| <b>Figura 24. a)</b> Termograma de TGA para hidrogel de quitosano con un 75% de entrecruzamiento y cargado con Piriproxifen. <b>b)</b> primera derivada..... | 47 |

## TABLA DE ANEXOS

|  |    |
|--|----|
| <b>Anexo 1.</b> Cálculo para la síntesis de hidrogeles de quitosano. ....        | 62 |
| <b>Anexo 2.</b> Reacción de entrecruzamiento del gluraldehído con el quitosano . | 66 |

## RESUMEN DEL PROYECTO

En la actualidad, más de 2500 millones de personas en más de 100 países corren el riesgo de contraer dengue (OMS, 2016). Esta enfermedad es transmitida por el insecto de la especie *Aedes aegypti*. No obstante, el mosquito también transmite arbovirus como: Chicunguña, Zika y Fiebre amarilla (OMS, 2016), lo que genera un problema de salud pública. Las estrategias de control vectorial utilizadas en Colombia se centran en la eliminación de criaderos y fumigaciones quincenales con larvicidas organofosforados (Cadavid *et al.*, 2014), lo que genera resistencia en la especie, contaminación en el medio ambiente y efectos nocivos para la salud humana (Cruz, 2002).

Con base en lo anterior, las nuevas estrategias de control vectorial pretenden implementar las formas de liberación modificadas, con el fin, de mantener los niveles del larvicida en el tiempo y lograr disminuir dos principales efectos: la resistencia de los insectos a los plaguicidas y la contaminación ambiental. Para lograr esto, el proyecto de grado tiene como objetivo general evaluar que los hidrogeles de quitosano cargados con el larvicida Novaluron son sistemas de liberación modificada, a partir de un estudio cinético.

Para ello, se sintetizaron hidrogeles de quitosano con dos grados de entrecruzamiento (25%, 75%) y cargado con dos concentraciones de Novaluron (50X y 100X), donde X es la dosis letal 99. Los resultados obtenidos indican que los hidrogeles con un 25% de entrecruzamiento liberan una mayor cantidad de larvicida a través del tiempo, en comparación con las matrices poliméricas que tenían un 75% de entrecruzamiento y se determinó que la cantidad de larvicida con la que se carga la matriz no es un factor limitante en la liberación. Por otro lado, los datos obtenidos en el perfil de liberación no se ajustaron a los modelos cinéticos analizados. Asimismo, se identificó que los hidrogeles con 100X y entrecruzados con 25% y 75% de glutaraldehído sufrieron efecto Burst.

En cuanto a los análisis térmicos, la técnica de DSC estableció que la Tg del quitosano se encuentra en un rango entre los 150 y 166°C. Por su parte, en los barridos termogravimétricos se evidenció dos casos de pérdida de masa; el primero comienza alrededor de los 34°C y finaliza cerca de los 200°C y se asocia a la pérdida de agua y el segundo evento empieza a los 200°C y termina a los 797°C y se atribuye a la degradación de la matriz polimérica de quitosano y la pérdida de compuestos volátiles.

**Palabras clave:** Hidrogeles, quitosano, Novaluron, liberación modificada, cinética, espectrofotometría UV-Visible.

## ABSTRACT

Nowadays, more than 2.5 billion people in more than 100 countries are at risk of contracting dengue (WHO, 2016). This disease is transmitted by the insect of the species *Aedes aegypti*. However, the gnat also transmits arboviruses such as Chicunguña, Zika and fiebre amarilla (WHO, 2016), which generates a public health problem. Vector control strategies used in Colombia focus on the elimination of biweekly hatcheries and fumigations with organophosphorus larvicides (Cadavid et al., 2014), which generates resistance in the species, contamination in the environment and harmful effects on human health (Cruz, 2002).

Based on the above, the new vector control strategies aim to implement the modified release forms, in order to maintain the larvicide levels over time and to reduce two main effects: the resistance of insects to pesticides and the environmental pollution. To achieve this, this project has as its general objective to evaluate that the chitosan hydrogels loaded with the larval Novaluron are modified release systems, from a kinetic study.

For this, chitosan hydrogels were synthesized with two degrees of crosslinking (25%, 75%) and loaded with two concentrations of Novaluron (50X and 100X), where X is the lethal dose 99. The results obtained indicate that the hydrogels with a 25% of cross-linking release a greater amount of larvicide over time, compared to polymeric matrices that had 75% cross-linking and it was determined that the amount of larvicide with which the matrix is loaded is not a limiting factor in the release. On the other hand, the data obtained in the release profile were not adjusted to the analyzed kinetic models. Likewise, it was identified that hydrogels with 100X and crosslinked with 25% and 75% of glutaraldehyde suffered Burst effect.

Regarding the thermal analysis, the DSC technique established that the Tg of the chitosan is in a range between 150 and 166 ° C. On the other hand, in thermogravimetric sweeps two cases of pesomasa loss were evidenced; the first begins around 34°C and ends near 200°C, this is associated with the loss of water and the second event starts at 200°C and ends at 797°C and is attributed to the degradation of the polymer matrix of chitosan and volatile compounds.

**Key words:** Hydrogels, chitosone, Novaluron, kinetics, UV-Visible spectrophotometry.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los sistemas de liberación modificada han sido muy utilizados en las últimas décadas, tanto en la industria farmacéutica como en la agrícola, debido a que presentan ventajas en cuanto a la velocidad y el lugar de liberación del fármaco o principio activo (Martín *et al.*, 2005). “El compuesto activo se incorpora en un soporte que generalmente está formado por un material polimérico o la combinación de varios polímeros” (Sáez *et al.*, 2002). Una de las materias primas más usadas para la fabricación de estas matrices es el quitosano, un derivado de la quitina que es el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa, se encuentra en las conchas de los crustáceos, forma parte del exoesqueleto de los insectos y de la pared celular de hongos y levaduras (Lárez, 2003).

Por medio, de una reacción de N-desacetilación la quitina se transforma en quitosano, un copolímero formado por unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina (Sánchez-Duarte *et al.*, 2017). La desacetilación de la quitina ocurre por una reacción de hidrólisis en los grupos acetamida, las condiciones de esta reacción son temperaturas altas y un medio alcalino. Generalmente, se utiliza hidróxido de sodio o hidróxido de potasio a temperaturas superiores a los 100°C (Sánchez-Duarte *et al.*, 2017). Por otro lado, los grupos amina libres le confiere solubilidad en pH ácido (Jyoti *et al.*, 2017).

El quitosano es considerado un material polimérico de primer orden debido a su biodegradabilidad y a que no posee propiedades tóxicas (Lárez, 2003), estas características le permiten ser un material adecuado para la síntesis de matrices poliméricas o hidrogeles. Los cuales son redes tridimensionales que al ponerse en contacto con un medio acuoso se hinchan hasta llegar a un equilibrio (Martínez, 2016). Por tal motivo, son muy utilizados para encapsular fármacos e insecticidas.

Por otro lado, el Novaluron es un larvicida del grupo de las benzoilfenil urea, su mecanismo de acción es inhibir la síntesis de la quitina, lo que ocasiona una interrupción a la ecdisis de los insectos (Pitts-Singer & Barbour, 2017), es decir, impide la capacidad de los artrópodos de desprenderse de su exoesqueleto. Por lo tanto, no pueden crecer y mueren en su estado juvenil. Es considerado, un insecticida de riesgo reducido ya que tiene una baja toxicidad en los mamíferos (Pitts-Singer & Barbour, 2017). Debido a estas características “la OMS, la agencia de protección ambiental en los Estados Unidos y la agencia reguladora del manejo de plagas en Canadá han aprobado el uso de este insecticida en las aguas domésticas para el control del insecto *Aedes aegypti*” (Naranjo & Beier, 2016).

El insecto *Aedes aegypti* es el principal causante de una problemática de salud pública, puesto que es el vector de enfermedades como; Dengue, Chikunguña, Zika y Fiebre amarilla (OMS, 2016). Por esta razón, se busca generar una estrategia útil y eficaz para la eliminación del mismo. Estudios anteriores han utilizado matrices poliméricas de quitosano cargadas con el larvicida Novaluron y los resultados obtenidos concluyeron que son una estrategia favorable para combatir el vector (Jaramillo, 2017). Por esta razón, este proyecto de grado se centró en estudiar los hidrogeles de quitosano cargados con Novaluron como sistemas de liberación modificada. El estudio implica la determinación de las concentraciones de larvicida liberadas a través del tiempo y el periodo en el que estas concentraciones se mantienen en el medio de liberación.

## 2. DESCRIPCION DEL PROYECTO

### 2.1 Planteamiento de la pregunta problema y justificación.

¿Son un sistema de liberación modificada las matrices poliméricas de quitosano cargadas con el larvicida Novaluron? ¿Son estos sistemas una estrategia eficaz para el control de enfermedades vectoriales?

Las enfermedades transmitidas por vectores se han convertido en un problema de salud pública a nivel mundial (Santos et al., 2013). El Insecto *Aedes aegypti*, es el principal causante de Dengue, Chicunguña, Zika y Fiebre amarilla. Estos arbovirus prevalecen en zonas tropicales y endémicas como Colombia (OMS, 2016). Según el boletín epidemiológico en el 2017 se han presentado 22,487 casos de Dengue. El municipio que presenta una mayor incidencia es el Valle del Cauca con 4,305 casos reportados (Gómez, 2017). Lo anterior, indica que las estrategias para mitigar esta problemática han sido poco efectivas. En 1993 se inició en la ciudad de Cali un programa para el control de vectores, enfocado en la aplicación quincenal de larvicidas en los 49,000 sumideros de la ciudad (Giraldo et al., 2008). El insecticida más utilizado es el Triflumurón, el cual inhibe la síntesis de la quitina, polisacárido estructural en la formación del exoesqueleto de los artrópodos (Grupo agrotecnología, 2017).

La incidencia de este tipo de enfermedades en nuestro país se ve influenciada por factores climáticos y sociales, como el empobrecimiento y la urbanización no planificada (Cabezas L, 2017). Además del elevado costo que generan las actuales estrategias de control vectorial, debido al mantenimiento de los niveles de los larvicidas en los sumideros a través del tiempo. Asimismo, el uso excesivo de estos que generan una contaminación al medio ambiente (Ladino, A., 2016).

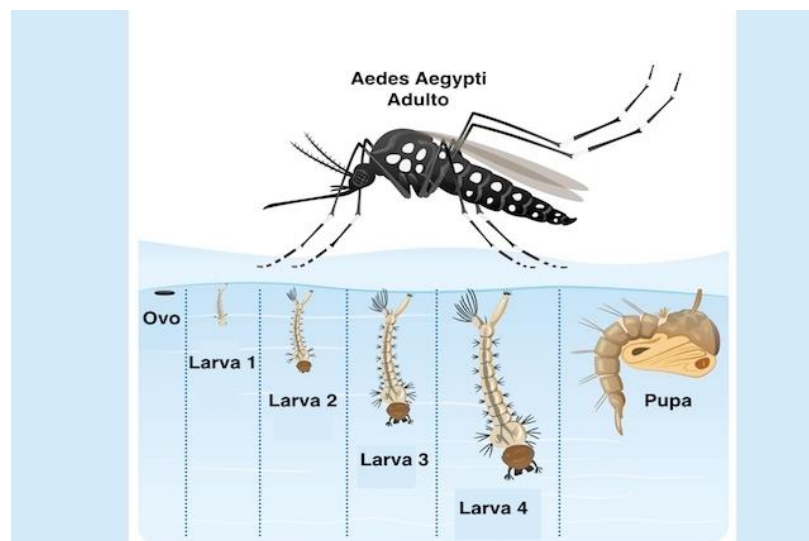
Actualmente, se realizan estudios para implementar nuevas técnicas de control vectorial que pretenden usar sistemas de liberación modificada. Estos sistemas se basan en la utilización de hidrogeles, los cuales se pueden definir como un tipo de material de base polimérica que se caracteriza por la capacidad para absorber agua (Martínez, 2016). El uso de sistemas de liberación controlada tiene como objetivo mejorar la seguridad y eficacia del principio activo, así como la protección del medio ambiente (Martín et al., 2005). En estudios anteriores se comprobó que el uso de matrices poliméricas de quitosano, con diferentes grados de entrecruzamiento y diferentes concentraciones del larvicida Novaluron, resulta ser una estrategia efectiva para el control vectorial (Ladino, A., 2016). Esta investigación busca evaluar que las matrices poliméricas de quitosano son un sistema de

liberación modificado, por medio del estudio de la cinética de liberación del larvicida a partir de hidrogeles.

## 2.2 Marco teórico y estado del arte

Las enfermedades transmitidas por vectores representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas y provocan el fallecimiento de más de 1 millón de personas cada año (OMS, 2016). El insecto *Aedes aegypti* es el principal vector que trasmite arbovirus como: Dengue, Chikunguña, Zika y Fiebre amarilla (OMS, 2016), los cuales son los de mayor prevalencia en zonas endémicas (OMS, 2016).

El *Aedes aegypti* es un insecto del género *Aedes* y del subgénero *Stegomyia* (Mousson, L., et al., 2005). Se encuentra en zonas urbanas donde la altura no supera los 2.200 msnm (OMS, 2016). Su ciclo de vida presenta cuatro etapas diferentes: huevo, larva, pupa y adulto. Las tres primeras etapas tienen lugar en el agua y la etapa adulta ocurre en el aire (Vélez et al., 1998). Cabe mencionar, que los seres humanos son infectados por la picadura de hembras que portan el virus, las cuales fueron infectadas al succionar la sangre de personas enfermas (OMS, 2016).



**Figura 1.** Ciclo de vida del insecto *Aedes aegypti*.<sup>1</sup>

Así mismo, el control vectorial es un tema preocupante para todos los países, para ello se han empleado técnicas como la eliminación total de los criaderos principalmente en zonas rurales, en donde el suministro de agua potable no

<sup>1</sup> Imagen tomada de [http:// sp.depositphotos.com/97504570/stock-illustration-nature-aedes-aegypti-mosquito-stilt.html](http://sp.depositphotos.com/97504570/stock-illustration-nature-aedes-aegypti-mosquito-stilt.html)



existe, es irregular o de baja calidad, por lo tanto, la comunidad almacena el agua en tanques, barriles y otros recipientes, los cuales sirven como hábitat para esta especie (Rodríguez Cruz, 2002). También, se realiza saneamiento ambiental y la aplicación de insecticidas. Estas estrategias han resultado poco efectivas, puesto que generan resistencia en la especie *Aedes aegypti*, un impacto negativo en el medio ambiente y reacciones adversas en los seres humanos (Cruz, 2002). Por otro lado, se han puesto en uso métodos alternos como las bacterias entomopatógenas, sin embargo bajo condiciones tropicales el máximo efecto fue de cuatro semanas (Fontoura *et al.*, 2012).

A causa de esta problemática, se han realizado investigaciones con el fin de implantar las formas de liberación modificada en las estrategias de control vectorial. Estas formas de liberación fueron desarrolladas por la ciencia farmacéutica, con el fin de dar solución a los problemas que conlleva la dosificación convencional de los medicamento (Martínez, 2016). Dichas formas de liberación se centran en alcanzar los niveles terapéuticos del fármaco en el lugar de acción y mantenerlos a lo largo del tratamiento, lo cual se logra por medio de la modificación de la velocidad, del tiempo y del lugar de liberación del medicamento (Suñé, 2000).

Entre las ventajas se encuentra: la reducción de la frecuencia de administración, la disminución de las fluctuaciones en los niveles plasmáticos, un efecto terapéutico más uniforme y la reducción de los efectos secundarios (Suñé, 2000). Sin embargo, este tipo de liberación no solo es usada en fármacos, sino también con insecticidas, teniendo como ventajas; un mayor control de la dosificación y un mantenimiento de la concentración del compuesto activo en el tiempo (Ladino, A., 2016). Por otro lado, los hidrogeles resultan ser la materia prima propicia para la producción de estos sistemas de liberación.

Ahora bien, los hidrogeles se definen como redes tridimensionales que tienen la capacidad de hincharse en un medio acuoso sin disolverse (Martínez, 2016). Son uno de los materiales más versátiles, debido a la facilidad con la que es posible incorporar nuevos agentes en su estructura y darles características específicas (Ramírez & Astudillo, 2016), es decir, se pueden modificar en función del tipo de entrecruzamiento, naturaleza del polímero, agente entrecruzante y tamaño del sistema (Martínez, 2016).

Los mecanismos por los cuales los hidrogeles liberan las moléculas son; difusión, hinchamiento y erosión (Andreotta, 2003). La migración del principio activo por difusión, se produce a través de los microporos existentes en la matriz polimérica. En este caso, la interpretación de este fenómeno puede realizarse utilizando la segunda ley de Fick's (Sáez *et al.*, 2004). Es importante tener en cuenta, la constante de difusión. Cuando la matriz presenta poca interacción con el fluido ingresante, esta se expande poco y la difusión del compuesto activo dependerá del fluido ingresante. Por lo tanto, la velocidad de liberación depende del gradiente de concentración. Sin embargo, cuando

la matriz tiene fuerte interacción con el fluido que ingresa, la expansión del polímero depende de sus propiedades fisicoquímicas como; el peso molecular, el gradiente de sustitución y la viscosidad. Por esto, la difusión del principio activo será función del fluido ingresante y las características de hinchamiento del polímero y la aplicación de la segunda ley de fick's será mucho más realista (Andreetta, 2003)

El hinchamiento se genera cuando un hidrogel entra en contacto con un medio líquido, se hincha o se deshincha hasta alcanzar el equilibrio, que es el resultado de un balance entre las fuerzas osmóticas originadas por el agua al entrar a la red de macromoléculas y las fuerzas cohesivas-elásticas ejercidas por las cadenas del polímero que se oponen a esa expansión (Martínez, 2016). Un aumento en el porcentaje de entrecruzamiento reduce el hinchamiento del hidrogel y el tamaño del poro, lo que limita la movilidad de las sustancias y conlleva a un control de la liberación de las mismas (Martínez, 2016).

Por otro lado, para fármacos muy solubles en agua, el fenómeno de erosión es poco importante, puesto que todo el fármaco es liberado antes de que suceda una degradación de la matriz polimérica. Por el contrario, para principios activos de baja solubilidad, el control de la liberación del ingrediente activo no solo ocurre por difusión, sino que también es importante el efecto de erosión (Sandoval *et al.*, 2008).

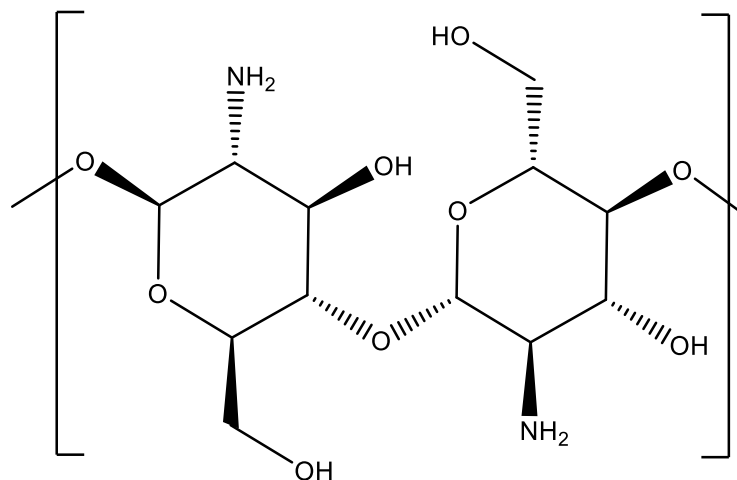
Dicho lo anterior, se puede definir la cinética de liberación como el modelo matemático que mejor representa el mecanismo de liberación de una matriz polimérica. Entre los modelos matemáticos se encuentran: orden cero, orden uno y orden dos. Se denomina modelo de orden cero aquella cinética donde la velocidad es independiente de la concentración (Soto, 2007). En el modelo cinético de orden uno la velocidad de disolución es proporcional a la concentración de fármaco disuelto (Viseras, 2008). Y en el modelo cinético de segundo orden la cantidad de principio activo disuelto es igual a su máxima solubilidad en el medio (Soto, 2007). En la tabla 1 se encuentran las ecuaciones que describen los modelos anteriormente nombrados.

**Tabla 1.** Ecuaciones de los modelos cinéticos.

| <b>Modelo Cinético</b> | <b>Ecuacion matemática</b>                        |
|------------------------|---|
| <b>Orden cero</b>      | $Q = Q_0 - k_0t$ (Soto, 2007)                     |
| <b>Orden uno</b>       | $Q = Q_0e^{-kdt}$ (Viseras, 2008)                 |
| <b>Orden dos</b>       | $\frac{1}{Q} = \frac{1}{Q_0} + k_2t$ (Soto, 2007) |

Donde  $Q$  es la cantidad de fármaco liberado,  $Q_0$  es la cantidad de fármaco inicial,  $K$  es la constante de velocidad y  $t$  es el tiempo (Viseras, 2008).

Por otra parte, en la actualidad existe un creciente interés en la producción de nuevos materiales a partir de fuentes renovables. Es decir, los polímeros sintéticos están siendo desplazados por los polímeros naturales (Neto et al., 2005). Un ejemplo de esto es la implementación de hidrogeles de quitosano. Este es un polisacárido lineal catiónico formado por unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina distribuidas aleatoriamente y unidos por enlaces  $\beta$ -(1-4) (Martínez, 2016). Dicha molécula es un derivado de la quitina, biopolímero que constituye el exoesqueleto de crustáceos e insectos (Jagadish Roy, 2017). El quitosano se obtiene por una reacción de *N*-desacetilación, proceso que no ocurre en un 100% (Ver figura1) (Neto et al., 2005).



**Figura 2.** Estructura química del quitosano.

El quitosano es una molécula que presenta grupos amino e hidroxilos libres, los cuales pueden ser fácilmente modificables ya sea químicamente y/o físicamente. Adicionalmente, éstos le confieren sensibilidad a los cambios de pH, dado que, son fácilmente protonables (Neto et al., 2005). Las ventajas de la utilización de los hidrogeles de quitosano se debe a la fácil biodegradabilidad, su biocompatibilidad y su poca toxicidad, por consiguiente resulta ser amigable con el medio ambiente (Wan Jun et al., 2005). Estas matrices poliméricas han sido implementadas en el ámbito farmacéutico, pero también pueden ser utilizadas como vehículo para minerales, vitaminas, aceites, proteínas e insecticidas (Kumar, 2004).

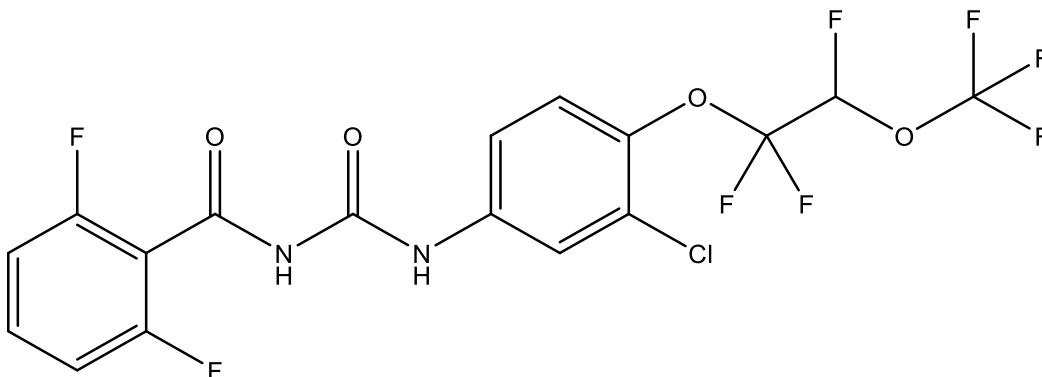
En la actualidad, las principales clases de insecticidas usados para el control vectorial son: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides (Bisset, 2002), aunque debido a la resistencia generada en el insecto y los problemas ambientales ocasionados, se ha implementado el uso de insecticidas microbianos y los reguladores de crecimiento (Bisset, 2002).

Estos insecticidas penetran el cuerpo del insecto por medio de las siguientes estrategias:

1. Envenenamiento por contacto: el insecticida penetra a través de la cutícula del insecto hasta alcanzar el sitio activo, como por ejemplo los inhibidores del crecimiento (Bisset, 2002).
2. Envenenamiento oral: El insecticida es ingerido y absorbido a través del intestino, por ejemplo insecticidas bacteriológicos (Bisset, 2002).
3. Fumigaciones: El insecticida penetra al cuerpo del insecto a través de los espiráculos del sistema respiratorio, como por ejemplo los diclorvos (Bisset, 2002).

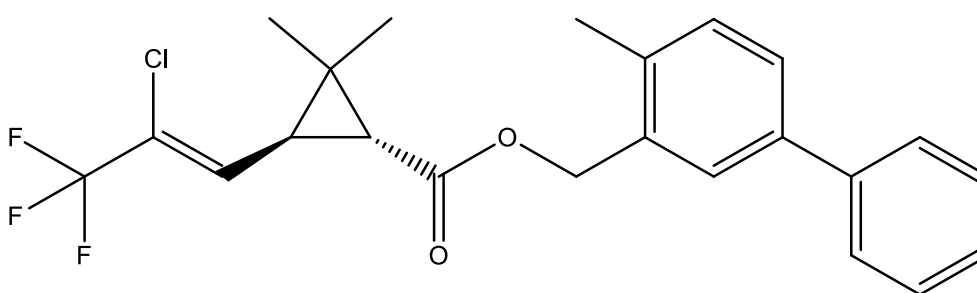
Este trabajo se centró en las benzoilfenil ureas, que son reguladores del crecimiento de los insectos (IGR), actúan inhibiendo la síntesis de la quitina de las larvas, en consecuencia resulta imposible que se realice el proceso de muda y por consiguiente los insectos pierden la hemolinfa, lo que ocasiona la muerte por deshidratación. Este tipo de larvicidas presentan alta especificidad, baja toxicidad para los mamíferos y son eficaces a bajas concentraciones por un largo periodo de acción (Maciel, W. G. 2016).

El Novaluron (1- [3-cloro-4- (1, 1,2-trifluoro-2-trifluorometoxi-etoxi) fenil] -3-(2,6-difluorobenzoil) urea) es un IGR inhibidor de la síntesis de la quitina que actúa por contacto o ingestión, particularmente en los estados inmaduros de los insectos (Ver figura 2)(Elek et al., 2010). Altera la composición de la cutícula, especialmente inhibiendo la síntesis de la quitina, lo que conlleva a una deposición endocuticular anormal que afecta la firmeza y la estabilidad de la cutícula y genera una muda abortiva (Cutler, Scott-Dupree, Tolman, & Harris, 2006). Por otro lado, es considerado un poderoso supresor de importantes plagas de lepidóptros y coleópteros. Según la organización mundial de la salud se recomienda que la dosis del larvicida en agua potable no debe de exceder los 0,05mg/L para ser considerado como seguro en los humanos (OMS, 2016).



**Figura 3.** Estructura química del larvicida Novaluron.

Es necesario mencionar, que la emulsión comercial de Novaluron que se usó en este proyecto de investigación contiene Bifentrina [(2 - metil - 1,1 - bifenil - 3 - il) - metil - 3- (2 - cloro - 3,3,3 - trifluoro - 1 - propenil) - 2,2 - Dimetilcicloprancarboxilato], insecticida ampliamente utilizado en la agricultura y en las zonas urbanas. Es un piretroide no sistemático de amplio espectro de actividad. Su principal desventaja es que presenta toxicidad en organismos acuáticos (Ver figura 3) (Kaiwei Shi, 2016). Estas moléculas presentan en su estructura química grupos funcionales con alta densidad electrónica, lo que facilita su detección por medio de técnicas analíticas como cromatografía líquida, gaseosa, espectrometría de masas y espectrofotometría UV-Visible.



**Figura 4.** Estructura química de la Bifentrina.

La espectrofotometría UV-Visible es una de las técnicas más empleadas para cuantificar un analito, debido a su costo relativamente bajo y gran número de aplicaciones desarrolladas. Esta técnica se basa en el análisis de la cantidad de radiación electromagnética, que puede absorber o transmitir una muestra, en función de la cantidad de sustancia presente, en el rango de longitudes de onda del ultravioleta y visible (Rocha & Teixeira, 2004). Por otra parte, técnicas como el análisis térmico brindan información acerca de las propiedades físicas de los materiales en función de la temperatura. Por ejemplo, los análisis térmicos que se basan en los cambios de peso constituyen la base de la termogravimetría, mientras que los cambios en energía son la base de la calorimetría de barrido diferencial (Madrid, 2010).

“La calorimetría de barrido diferencial (DSC) mide la energía que se necesita suministrar a la muestra para mantenerla a la misma temperatura que la referencia” (Madrid, 2010), es decir mide los cambios entálpicos. Ésta técnica se desarrolla en un intervalo de  $-196^{\circ}\text{C}$  hasta los  $600^{\circ}\text{C}$ , temperaturas donde suceden las transiciones térmicas de los polímeros como: la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), la temperatura de fusión ( $T_m$ ), estudios de compatibilidad de polímeros y reacciones de polimerización. La muestra y la referencia se depositan en dos celdas idénticas que se calientan por medio de resistencias independientes, cuando la muestra sufre una transición térmica, se adiciona energía a la muestra o a la referencia con el fin de mantener ambas a una misma temperatura (Madrid, 2010).

Por otro lado, el análisis termogravimétrico registra de manera continua, la masa de una muestra que se encuentra en una atmosfera controlada en función del tiempo. Los instrumentos para realizar análisis termogravimétricos están conformados por: balanza analítica, horno, sistema de purga (proporciona una atmósfera inerte) y un microordenador para el control de los datos(Madrid, 2010).

## 2.3 Objetivos

### 2.3.1 Objetivo general

Evaluar que los hidrogeles de quitosano cargados con Novaluron son sistemas de liberación modificada y determinar el tiempo en el que se alcanza la dosis letal 99.

### 2.3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar hidrogeles de quitosano con diferentes grados de entrecruzamiento y cargados con diferentes concentraciones del larvicida Novaluron.
- Determinar la cinética de liberación del larvicida Novaluron desde hidrogeles de quitosano.
- Identificar el modelo cinético al cual se ajusta la liberación del larvicida Novaluron desde hidrogeles de quitosano.

## 2.4 Metodología

### 2.4.1 Reactivos, materiales y equipos empleados

Para la síntesis de los hidrogeles de quitosano con diferentes grados de entrecruzamiento (25% y 75%) y cargados con distintas concentraciones de Novaluron (50X y 100X, asumiendo que X es la dosis letal 99), se emplearon los siguientes reactivos y equipos (Ver Tabla 2 y Tabla 3).

**Tabla 2.** Reactivos empleados para la síntesis de hidrogeles de Quitosano.

| <b>Reactivos</b>  | <b>Concentración</b>               | <b>Casa comercial</b> |
|---|------------------------------------|-----------------------|
| <b>Quitosano</b>  | 98%                                | Sigma-Aldrich         |
| <b>Ácido acético glacial</b>                                  | 99,5%                              | Sucromiles S.A.       |
| <b>Glutaraldehído</b>   | 25%                                | Protectol             |
| <b>Emulsión Rimon Duo:<br/>Bifentrina<br/>y<br/>Novaluron</b> | Bifentrina 5%<br>y<br>Novaluron 5% | Proficol              |

**Tabla 3.** Equipos de laboratorio.

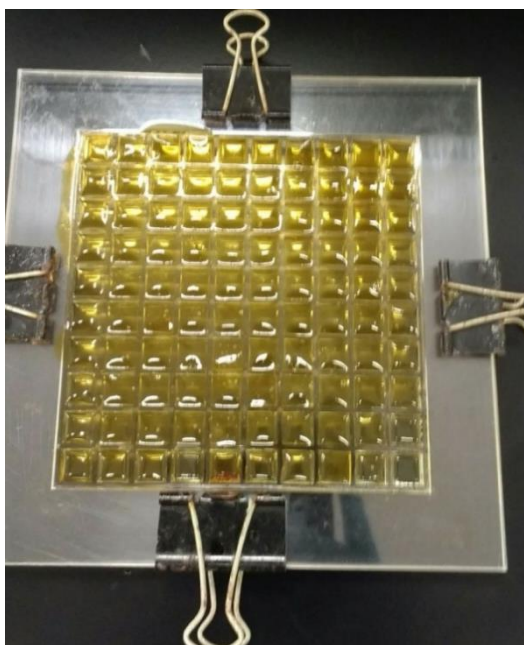
| <b>Equipos</b>                        | <b>Marca</b>   |
|---------------------------------------|----------------|
| <b>Balanza analítica</b>              | Mettler Toledo |
| <b>Horno<br/>de<br/>calentamiento</b> | Binder         |
| <b>Cabinas<br/>de<br/>extracción</b>  | Esco           |
| <b>Plancha<br/>de<br/>agitación</b>   | VWR            |
| <b>Homogenizador</b>                  | Ultraturrax    |

2.4.2 Síntesis de hidrogeles de quitosano con dos grados de entrecruzamiento y cargados con dos concentraciones diferentes de Novaluron.

Los controles son matrices poliméricas que tienen los mismos componentes de fabricación, pero no se encuentran cargadas con el larvicida. Para sintetizar los controles se preparó una solución al 3% de quitosano en ácido acético al 2%. Posteriormente, se adicionó la cantidad necesaria de glutaraldehído para obtener el grado de entrecruzamiento (25% o 75%)



requerido. La mezcla de los reactivos se realizó en una plancha, con el fin, de mantener la agitación contante. Después de conseguir una solución homogénea, ésta se llevó al equipo de ultrasonido por una hora y con ayuda de una espátula cóncava se extrajeron las burbujas generadas en el proceso. La solución se vertió en un molde de 10cm X 10cm sobre un vidrio previamente silanizado, para evitar la adhesión del hidrogel. El molde se llevó al horno a una temperatura de 28,5°C, con el fin, de realizar el entrecruzamiento por un periodo de 48 horas, finalmente se cortaron los hidrogeles con ayuda de una espátula universal y se pusieron en una superficie antiadherente por un día, posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.



**Figura 5.** Molde con hidrogeles de Quitosano.

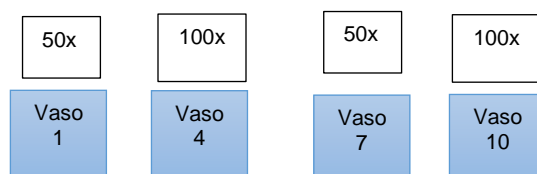


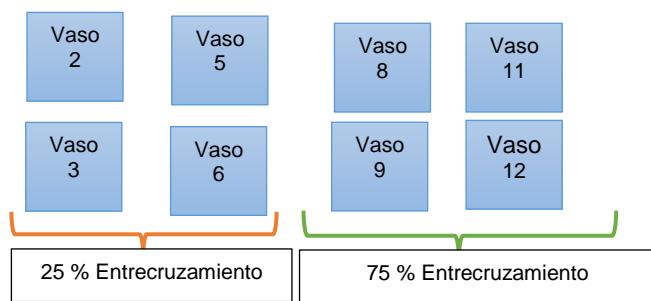
**Figura 6.** Hidrogeles de Quitosano en proceso de secado.

La síntesis de hidrogeles de quitosano cargados con diferentes concentraciones del larvicida Novaluron (50X y 100X) se realizó disolviendo la emulsión comercial O/W de Rimon Duo (Bifentrima y Novaluron) en ácido acético al 2%, se agregó en cada caso la cantidad necesaria de emulsión. Posteriormente, se adicionó 3g de quitosano a la mezcla, dado que la solución era muy viscosa se utilizó el homogeneizador ultraturrax por un intervalo de 15 minutos y a una velocidad de 20 rpm. De esta forma se garantizó la completa homogenización de la solución y la menor cantidad de burbujas. Finalmente, se adicionó la solución de glutaraldehído para obtener el entrecruzamiento respectivo y se siguieron todos los pasos explicados anteriormente para la síntesis de los controles. Finalmente se obtuvieron hidrogeles; 50X 25%, 100X 25% y 50X 75% y 100X 75%.

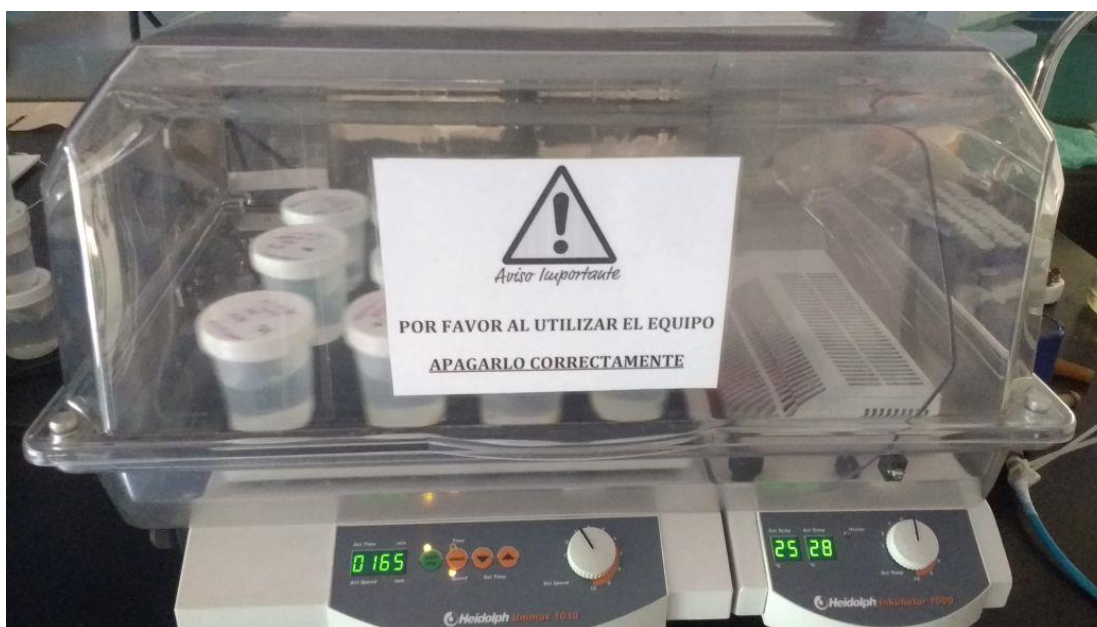
#### 2.4.3 Liberación del larvicida Novaluron desde matrices poliméricas de quitosano.

Una muestra de cada hidrogel con diferente concentración de larvicida (50X o 100X) y con distinto grado de entrecruzamiento (25% o 75%), se ubicó en un recipiente plástico que contenía una mezcla de metanol/agua destilada en una proporción de 60:40. Los recipientes con las muestras fueron llevados a una incubadora de agitación Shaker, a 25°C y a una agitación de 165 rpm, con el fin, de garantizar que las muestras no se afectaran por la temperatura y que la solución fuera homogénea (Ver Figura 3). Cabe resaltar que todos los experimentos se realizaron por triplicado para que fuera estadísticamente válido.





**Figura 7.** Diseño de experimentos empleado para el estudio de la cinética.



**Figura 8.** Muestras de hidrogel de quitosano, en incubadora de agitación, Shaker.

Para seguir la liberación del larvicida se tomaron a distintos tiempos alícuotas de aproximadamente 3 mL de la disolución donde se encontraba inmersa la pastilla y se determinó la concentración de Novaluron. Es decir, el primer día se tomaron tres alícuotas en un periodo de nueve horas y los siguientes días dos alícuota cada nueve horas por un espacio de diez días.

#### 2.4.4 Cuantificación de la concentración de Novaluron liberado desde las matrices poliméricas de quitosano.

La cuantificación del larvicida liberado se hizo por medio del espectrofotómetro Shimadzu con detector Uv- visible. Inicialmente, se realizó una curva de calibración con un estándar de Novaluron 99%. Las soluciones con diferentes concentraciones para construir la curva se prepararon en balones aforados de 25 ml y se utilizó como solvente una solución de metanol:agua (60:40). La curva está conformada por seis puntos (1,4 ppm, 2,8 ppm, 5,5 ppm, 11 ppm, 20 ppm y 30 ppm). Se realizó un barrido desde

190 hasta 800 nm con el fin de determinar el máximo de absorbancia de la molécula, el cual fue encontrado a 262 nm. Se utilizaron celdas de cuarzo para minimizar los errores instrumentales.



**Figura 9.**Espectrofotómetro Shimadzu.

#### 2.4.5 Tiempo de equilibrio

Con el fin, de establecer el tiempo en el que se mantiene la dosis del larvicida en el medio de liberación, se realizó un diseño de experimentos, el cual consistía en poner una muestra de hidrogel de diferente concentración y distinto grado de entrecruzamiento en un medio de metanol: agua destilada (60:40) por 15 días. Pasado este tiempo se tomaron alícuotas para cuantificar la concentración del compuesto activo liberado y se realizó el recambio del medio de liberación. Lo anterior, se efectuó por 45 días.

#### 2.4.6 Uniformidad de contenido

Para determinar la cantidad de larvicida y la uniformidad de dosis encapsulada en los hidrogeles de quitosano, se realizó una prueba de uniformidad de contenido, para esto se maceraron muestras de hidrogeles (50X 25%, 100X 25%, 50X75% y 100X75%). El polvo obtenido después de la maceración de las matrices poliméricas fue adicionado a un recipiente que contenía 100 mL de una solución 60:40 metanol: agua destilada por 24 horas. Posteriormente, se tomaron alícuotas que se filtraron y se llevaron al espectrofotómetro UV-Visible para cuantificar la cantidad de larvicida presente en los hidrogeles. Este procedimiento se realizó por triplicado.

#### 2.4.7 Calorimetría de barrido diferencial

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) se realizó con un DSC modelo Q2000 de TA Instruments. Las muestras se analizaron en atmósfera de nitrógeno. Se realizaron tres exploraciones, la primera de 3-95°C durante 30

minutos con el fin de eliminar el agua ligada dentro del material y el segundo para observar las diferentes transiciones que pueden ocurrir dentro del material. Todos estos ciclos se realizaron a una velocidad de calentamiento de  $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Es importante resaltar, que la máxima temperatura fue de  $200^{\circ}\text{C}$  para evitar la degradación del polímero.

#### 2.4.8 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico se realizó en la Universidad Nacional de Bogotá, en el laboratorio de ingeniería Química. Se utilizó un TGA de marca Mettler Toledo. El método consistió en mantener el horno por un minuto a  $25^{\circ}\text{C}$  con un flujo de aire de  $50\text{ ml/min}$ . Posteriormente, se llevó de  $25^{\circ}\text{C}$  a  $800^{\circ}\text{C}$  con una rampa de calentamiento de  $200\text{ K/min}$  y con un flujo de nitrógeno de  $50\text{ ml/min}$  y finalmente de  $800^{\circ}\text{C}$  hasta los  $1000^{\circ}\text{C}$  con una rampa de calentamiento de  $70,01\text{ K/min}$  y con un flujo de aire de  $50\text{ ml/min}$ .

#### 2.4.9 Matriz de marco lógico

| <p><b>Objetivo General:</b> Evaluar que los hidrogeles de quitosano cargados con Novaluron son sistemas de liberación modificada y determinar el tiempo en el que alcanza la dosis letal 99.</p>                  |   |   |  |
|---|---|---|--|
| Objetivo Especifico   | Actividades   | Supuesto  | Indicador  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Sintetizar hidrogeles de quitosano con diferentes grados de entrecruzamiento de glutaraldehído y cargados a diferentes concentraciones del larvicida Novaluron.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Adquirir la materia prima y los reactivos.</li> <li>Ejecutar el protocolo establecido para realizar la síntesis de matrices poliméricas de quitosano con diferentes grados de entrecruzamiento (25%,75%) de glutaraldehído y concentraciones ( 50X, 100X) del larvicida Novaluron. (X=Dosis letal 99)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Disponibilidad del material de laboratorio.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Matrices poliméricas de quitosano obtenidas.</li> </ul> |

|   |   |   |  |
|---|---|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinar la cinética de liberación del larvicida Novaluron desde hidrogeles de quitosano.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Establecer un diseño de experimento para los hidrogeles de quitosano con diferentes grados de entrecruzamiento de Glutaraldehído y diferentes concentraciones de Novaluron.</li> <li>• Realizar una curva de calibración con el fin de determinar la concentración del larvicida Novaluron, por medio el equipo espectrómetro con detector UV-Visible.</li> <li>• Cuantificar las muestras por medio del equipo espectrofotómetro UV-Visible.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Disponibilidad del equipo y calibración adecuada del mismo.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Liberación del larvicida cuantificada.</li> <li>• Periodo en el que se alcanza la dosis letal 99 determinados.</li> </ul> |
|---|---|---|--|

|  |   |  |  |
|--|---|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Identificar el modelo cinético al cual se ajusta la liberación del larvicida Novaluron desde hidrogeles de quitosano</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinar el modelo cinético que sigue el sistema, mediante la aplicación de los modelos matemáticos como; Primer orden y orden dos.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Los datos de los perfiles de liberación se ajusten a un modelo cinético.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Modelo cinético al que se ajusta la liberación del larvicida determinado .</li> </ul> |
|--|---|--|--|

## 2.5 Resultados

### 2.5.1 Síntesis de hidrogeles de quitosano.

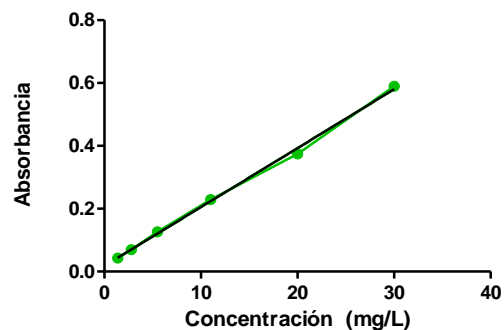
La emulsión de Novaluron de tipo O/W se mezcló con la solución de ácido acético al 2%. Posteriormente, se adicionó 3 g de quitosano y se utilizó el homogenizador Ultraturrax, que generó soluciones homogéneas y disminuyó el efecto vortex producido por el magneto. Se usó una solución de glutaraldehído al 2,5% como agente entrecruzante. Con esta concentración se logró adicionar la solución de quitosano en el molde y llevarlo al horno sin que la mezcla se gelificara antes de tiempo; el proceso de entrecruzamiento se realizó a 28°C durante dos días. La apariencia final de las muestras fueron pastillas cuadradas de color amarillo para el caso de los controles, para los hidrogeles que se encontraban cargados con larvicida su color era un poco más oscuro.



2.5.2 Determinación de la cinética de liberación del larvicida Novaluron a partir de una matriz polimérica de quitosano.

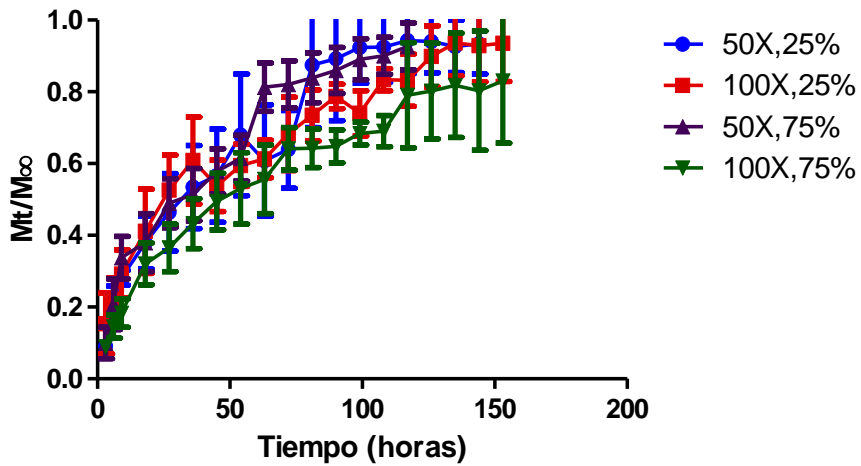
Inicialmente, los hidrogeles cargados con dos concentraciones del larvicida (50X y 100X) y con dos grados de entrecruzamiento (25% y 75%) se introdujeron en una solución de agua destilada. Debido a que la molécula de Novaluron tiene baja solubilidad en este solvente, la liberación no sucedió de manera correcta. Por lo tanto, se cambió el medio de liberación por una solución 60:40 de metanol/agua destilada. El metanol se adicionó para disminuir la constante dieléctrica del agua y mejorar la solubilidad del larvicida en el medio.

Con el fin de determinar las concentraciones de las muestras se realizó una curva de calibración con seis puntos (1,4 ppm, 2,8 ppm, 5,5 ppm, 11 ppm, 20 ppm y 30 ppm). La regresión lineal tiene como ecuación  $Absorbancia = 0,0187 \text{ concentración} + 0,0181$  y un  $r^2 = 0,9979$ , lo que indica que los datos se ajustan a una línea recta. Por lo tanto, se infiere que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de las muestras. En la gráfica 1 se observa la curva de calibración del estándar de Novaluron.



**Gráfica 1.** Curva de calibración del estándar Novaluron

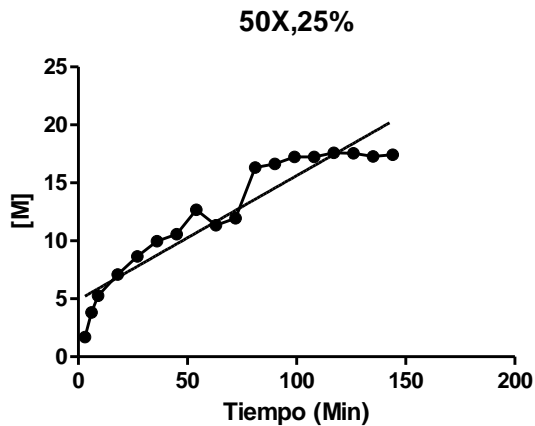
Para determinar la cinética de liberación del larvicida se graficó  $\frac{M_t}{M_\infty}$  vs tiempo para cada una de las muestras, donde  $M_t$  es la concentración a un tiempo determinado y  $M_\infty$  es la máxima concentración liberada (Ver gráfica 2).



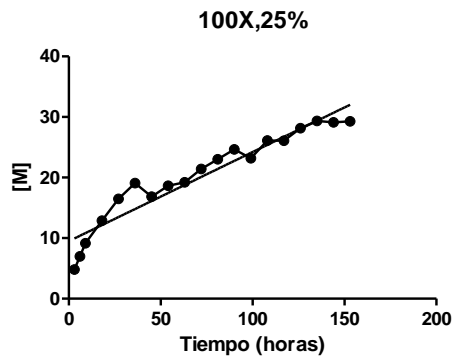
**Gráfica 2.** Cinética de liberación del larvicida Novaluron

### 2.5.3 Ajuste al modelo cinético.

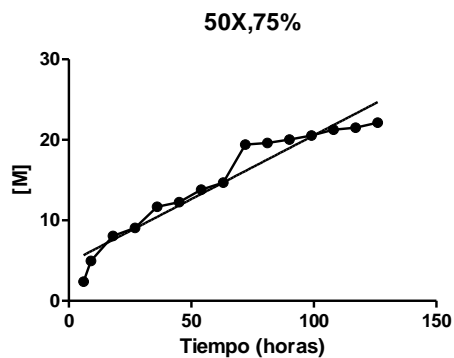
Para identificar el modelo matemático al que se ajusta la cinética de liberación del larvicida Novaluron, se graficó  $[M]$  vs tiempo y de esta manera se ajustaron los datos al modelo cinético orden cero (Ver gráficas 3, 4, 5 y 6).



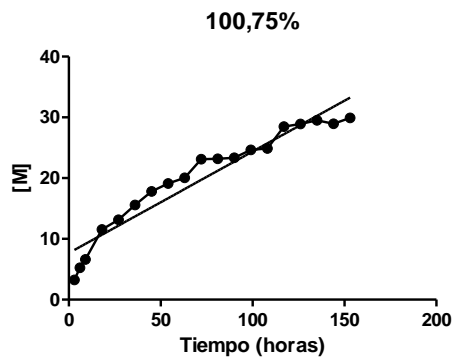
**Gráfica 3.** Ajuste al modelo cinético orden cero para hidrogeles con 50X y 25% de entrecruzamiento ( $r^2 = 0,8898$ ).



**Gráfica 4.** Ajuste al modelo cinético orden cero para hidrogel con 100X y 25% de entrecruzamiento ( $r^2= 0,9128$ ).



**Gráfica 5.** Ajuste al modelo cinético orden cero para hidrogel con 50X y 75% de entrecruzamiento ( $r^2= 0,9314$ ).



**Gráfica 6.** Ajuste al modelo cinético orden cero para hidrogel con 100X y 75% de entrecruzamiento ( $r^2=0,9227$ ).

De igual modo, los datos se ajustaron a los modelos cinéticos de primer orden y de segundo orden. En la tabla 4 se encuentran los coeficientes de correlación para cada uno de los modelos evaluados.

**Tabla 4.** Coeficientes de correlación para cada modelo cinético.

| Muestras  | Modelos cinéticos | Coeficiente de correlación |
|-----------|-------------------|----------------------------|
| 50X, 25%  | Orden cero        | 0,8898                     |
|           | Orden uno         | 0,6879                     |
|           | Orden dos         | 0,5203                     |
| 100X, 25% | Orden cero        | 0,9128                     |
|           | Orden uno         | 0,7512                     |
|           | Orden dos         | 0,5350                     |
| 50X, 75%  | Orden cero        | 0,9314                     |
|           | Orden uno         | 0,7613                     |
|           | Orden dos         | 0,4436                     |
| 100X, 75% | Orden cero        | 0,9227                     |
|           | Orden uno         | 0,7386                     |
|           | Orden dos         | 0,4887                     |

#### 2.5.4 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis estadístico diseño factorial  $2^k$ , con el fin de determinar si hay similitud o diferencia entre las matrices poliméricas utilizadas en el proyecto de investigación, es decir, como influye el grado de entrecruzamiento y la concentración de larvicida en el hidrogel, con respecto a la cantidad de Novaluron liberado a través del tiempo. Para esto se calculó el área bajo la curva de las gráficas obtenidas en la cinética de liberación de cada muestra y sus repeticiones.

A continuación, se encuentran las hipótesis nulas ( $H_0$ ) e hipótesis alterna ( $H_A$ ) planteadas para cada caso.

#### **Grado de entrecruzamiento**

$H_0$ : No hay diferencia significativa en el grado de entrecruzamiento.

$H_1$ : Si hay diferencia significativa en el grado de entrecruzamiento.

### Cantidad de larvicida

H<sub>0</sub>: No hay diferencia significativa con la cantidad de larvicida.

H<sub>1</sub>: Si hay diferencia significativa con la cantidad de larvicida.

### Interacción

H<sub>0</sub>: No existe interacción entre el grado de entrecruzamiento y la cantidad de larvicida.

H<sub>1</sub>: Existe interacción entre el grado de entrecruzamiento y la cantidad de larvicida.

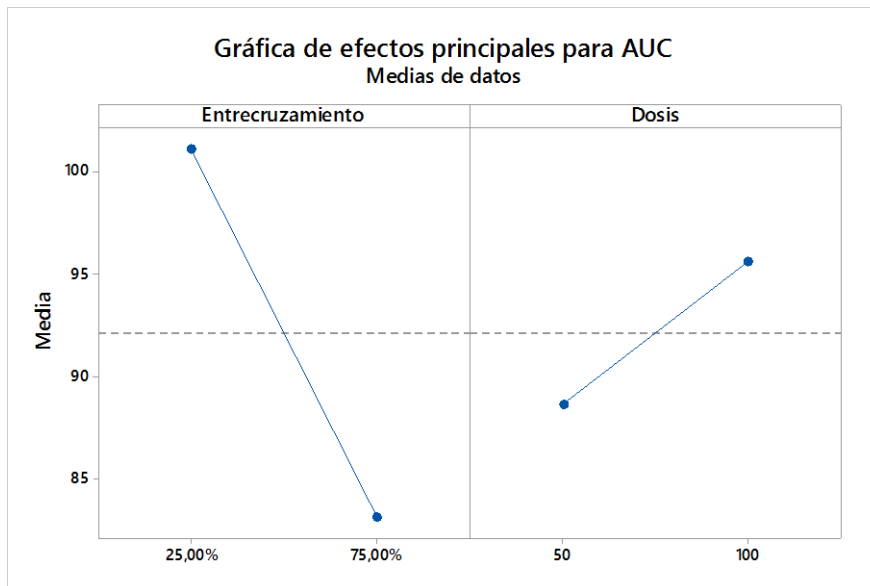
Para comprobar estas hipótesis se toma el valor p como valor de referencia con un alfa ( $\alpha$ ) de 0,05. Si  $p > \alpha$  la hipótesis nula se acepta. En la tabla 5 se encuentran los datos obtenidos en el diseño factorial 2<sup>2</sup>.

**Tabla 5.** Análisis de varianzas

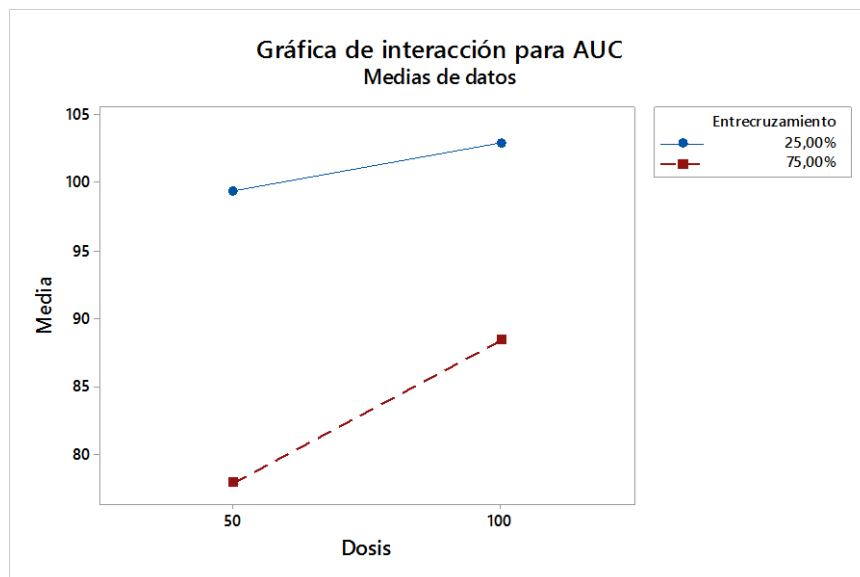
#### Análisis de Varianza

| Fuente                 | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|------------------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Entrecruzamiento       | 1  | 966,80    | 966,80    | 7,27    | 0,027   |
| Dosis                  | 1  | 146,94    | 146,94    | 1,11    | 0,324   |
| Entrecruzamiento*Dosis | 1  | 36,15     | 36,15     | 0,27    | 0,616   |
| Error                  | 8  | 1063,65   | 132,96    |         |         |
| Total                  | 11 | 2213,55   |           |         |         |

Para el grado de entrecruzamiento, se observa  $p < \alpha$ , por lo tanto hay diferencia estadística significativa. Sin embargo, para la cantidad de larvicida y la interacción entre ambos factores  $p > \alpha$ , esto implica, que no hay diferencia estadística significativa. Para confirmar lo obtenido en el análisis de varianza se realizaron las gráficas factoriales de los efectos principales y las interacciones (Gráfica 7 y Gráfica 8).



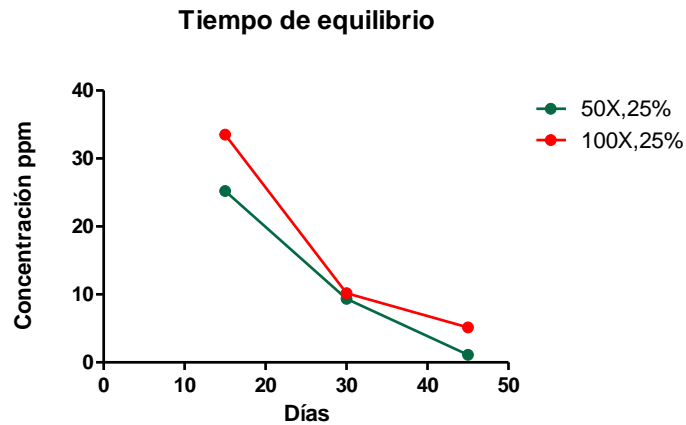
**Gráfica 7.** Gráficas factoriales de efectos principales.



**Gráfica 8.** Gráfica factorial de interacciones.

### 2.5.5 Tiempo de equilibrio

Las concentraciones obtenidas para el experimento de tiempo de equilibrio se graficaron (ver gráfica 9).



**Gráfica 9.** Tiempo de equilibrio

### 2.5.6 Uniformidad de dosis

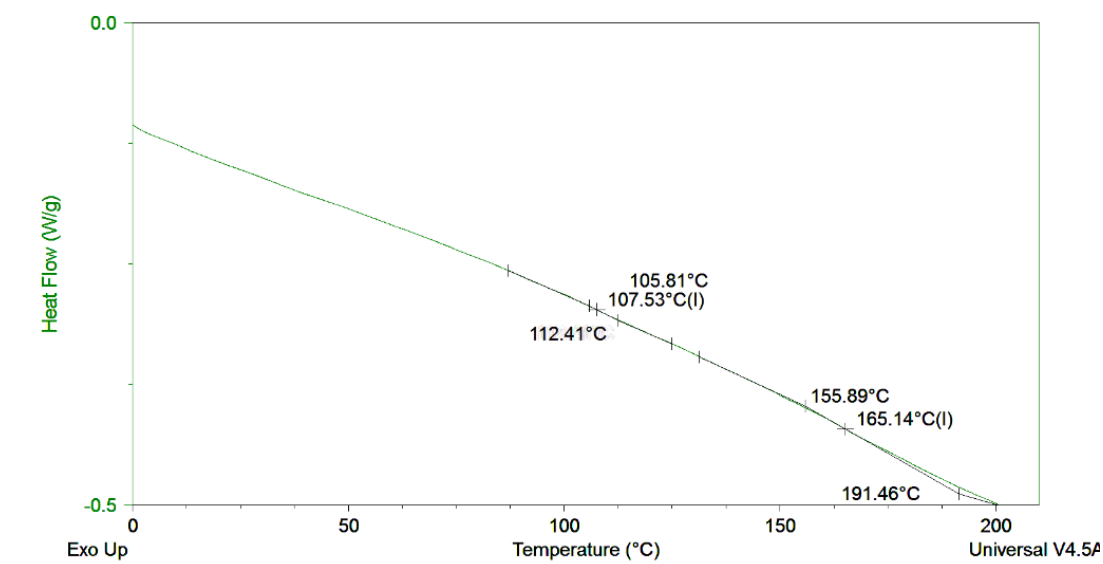
Para determinar la cantidad y uniformidad de larvicida encapsulado en las matrices poliméricas se realizó una prueba de uniformidad de contenido, los datos obtenidos se encuentran en la tabla 6.

**Tabla 6.** Datos de prueba de uniformidad de contenido.

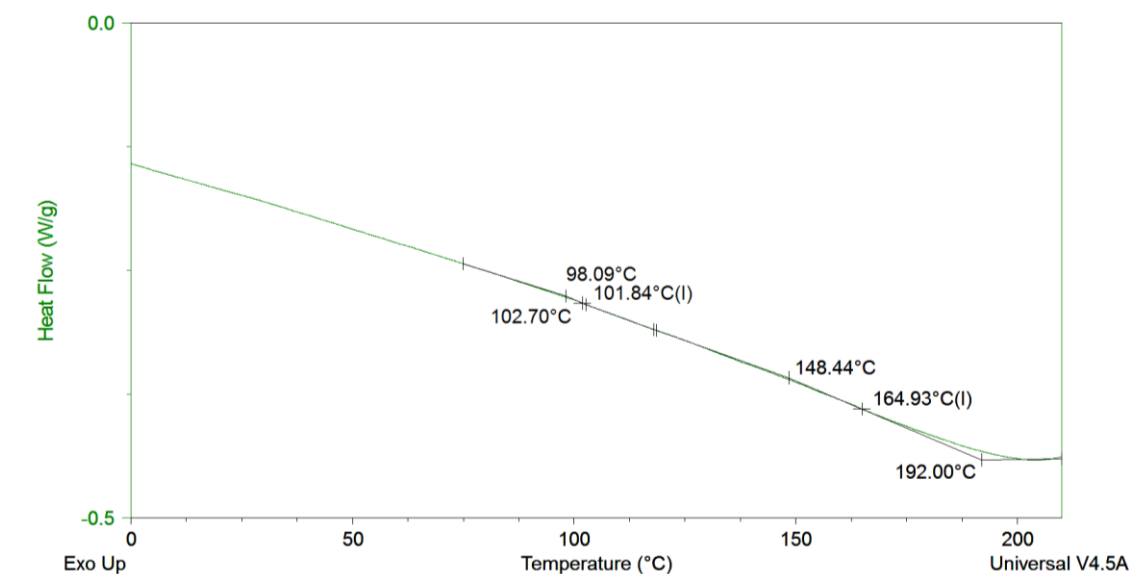
| <b>Muestra</b>                      | <b>concentració<br/>n (mg/L)<br/>hidrogeles<br/>50X,25%</b> | <b>concentració<br/>n (mg/L)<br/>hidrogeles<br/>100X,25%</b> | <b>Concentració<br/>n (mg/L)<br/>hidrogeles<br/>50X,75%</b> | <b>Concentració<br/>n<br/>(mg/L)<br/>hidrogeles<br/>100X,75%</b> |
|-------------------------------------|---|--|---|--|
| <b>Muestra 1</b>                    | 19,10   | 46,57  | 27,68   | 39,48  |
| <b>Muestra 2</b>                    | 22,69   | 45,91  | 26,00   | 40,16  |
| <b>Muestra 3</b>                    | 23,70   | 45,84  | 26,91   | 41,08  |
| <b>Promedio</b>                     | 21,83   | 46,11  | 26,86   | 40,29  |
| <b>Desviació<br/>n<br/>estándar</b> | 2,42  | 0,40   | 0,84  | 0,81   |
| <b>% de<br/>Error</b>               | 20,62   | 16,16  | 2,33  | 26,75  |

### 2.5.7 Análisis térmicos

De la Figura 14 a la Figura 23 se encuentran los resultados obtenidos por medio de la técnica de calorimetría de barrido diferencial (DSC). Y de la Figura 24 a la Figura 29 el análisis termogravimétrico para las diferentes muestras de hidrogeles de quitosano, con diferentes grados de entrecruzamiento y cargados con dos clases de larvicidas (Novaluron y Piriproxifen).

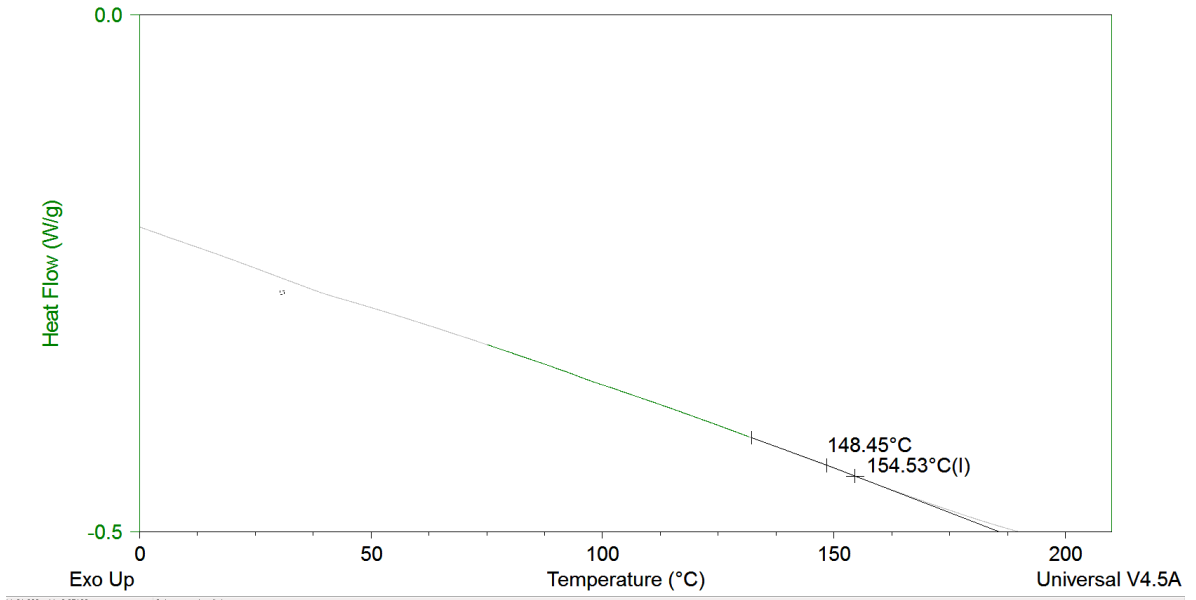


**Figura 10.** Termograma del Hidrogel de quitosano con un 25% de entrecruzamiento.

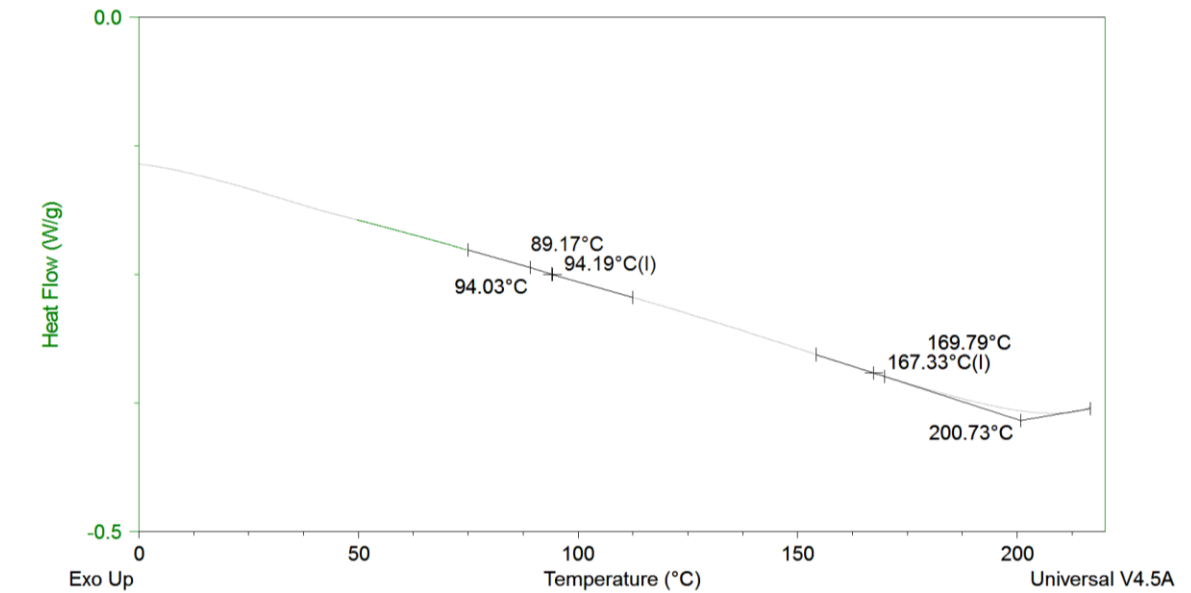


**Figura 11.** Termograma del hidrogel de quitosano con un 75% de entrecruzamiento.

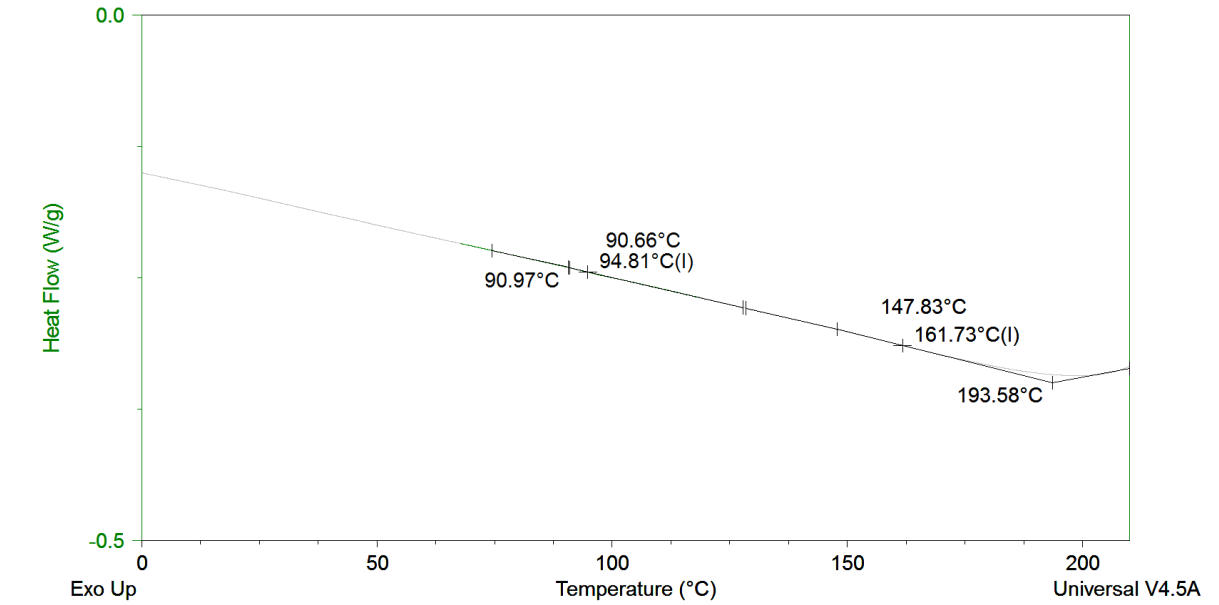




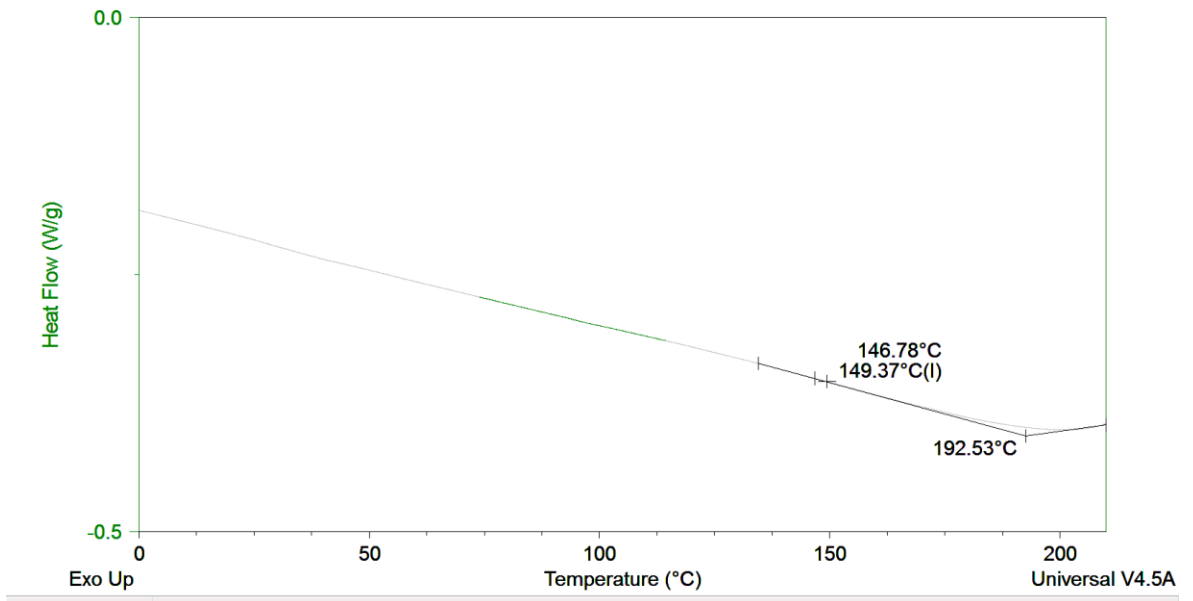
**Figura 12.** Termograma del hidrogel de quitosano con un 25% de entrecruzamiento y cargado con Novaluron.



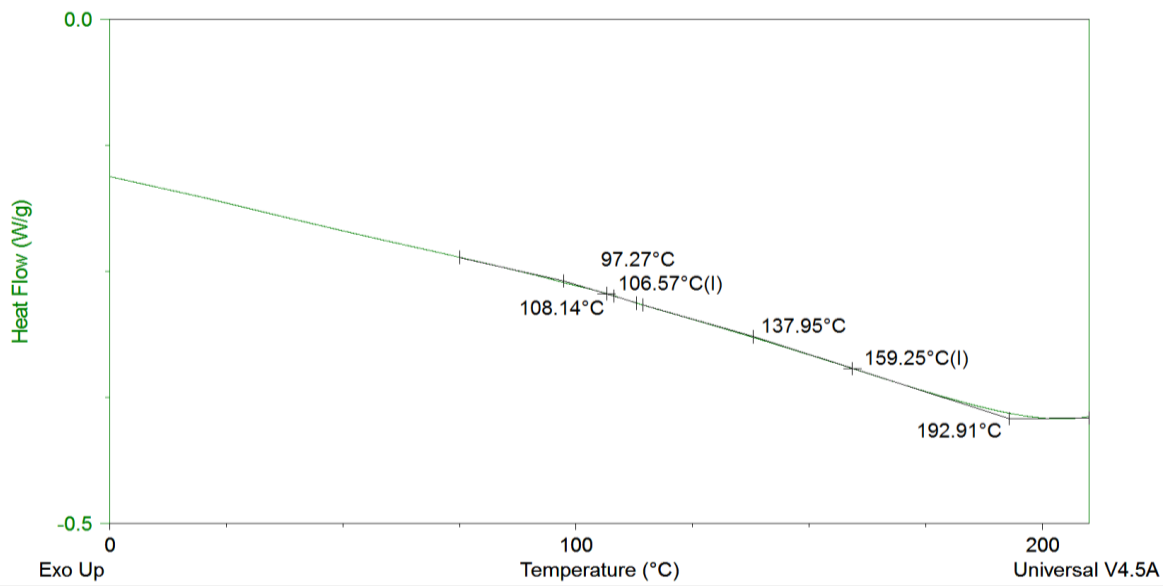
**Figura 13.** Termograma del hidrogel quitosano con un 25% de entrecruzamiento y cargados con 5X de Novaluron.



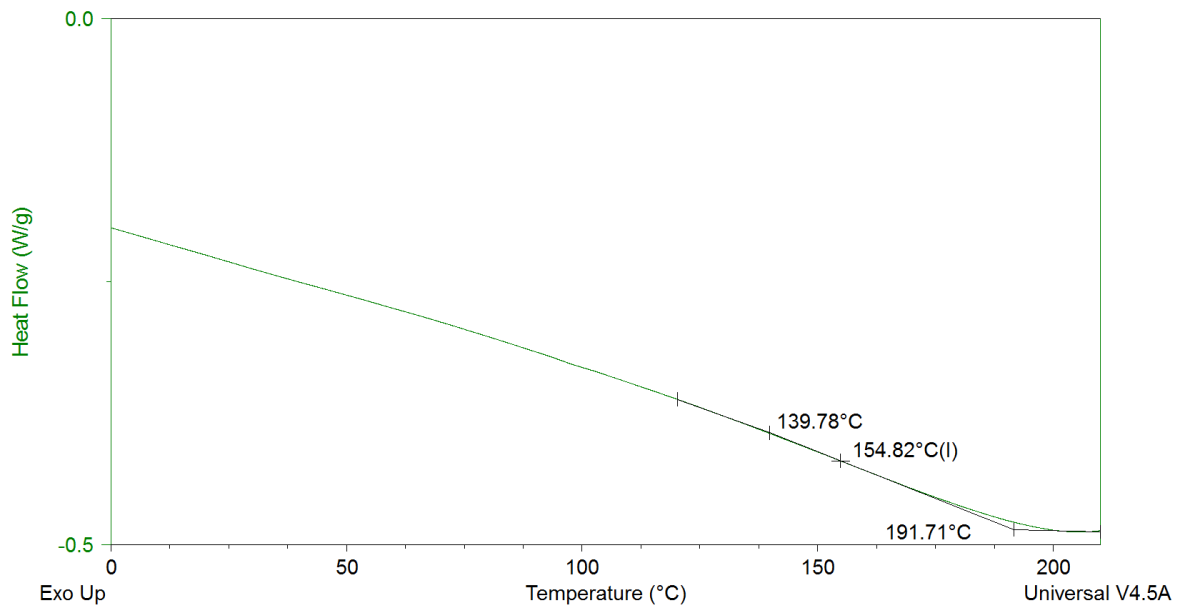
**Figura 14.** Termograma del hidrogel de quitosano con un 75% de entrecruzamiento y cargados con 5X de Novaluron.



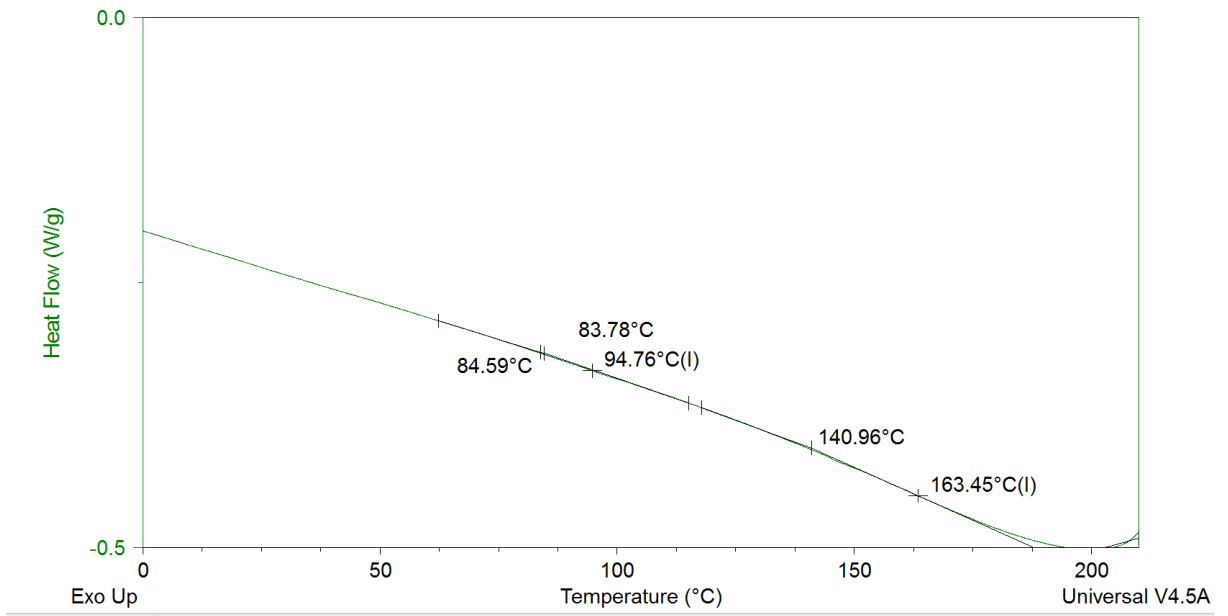
**Figura 15.** Termograma del hidrogel de quitosano con un 75% de entrecruzamiento y cargados con 10X de Novaluron



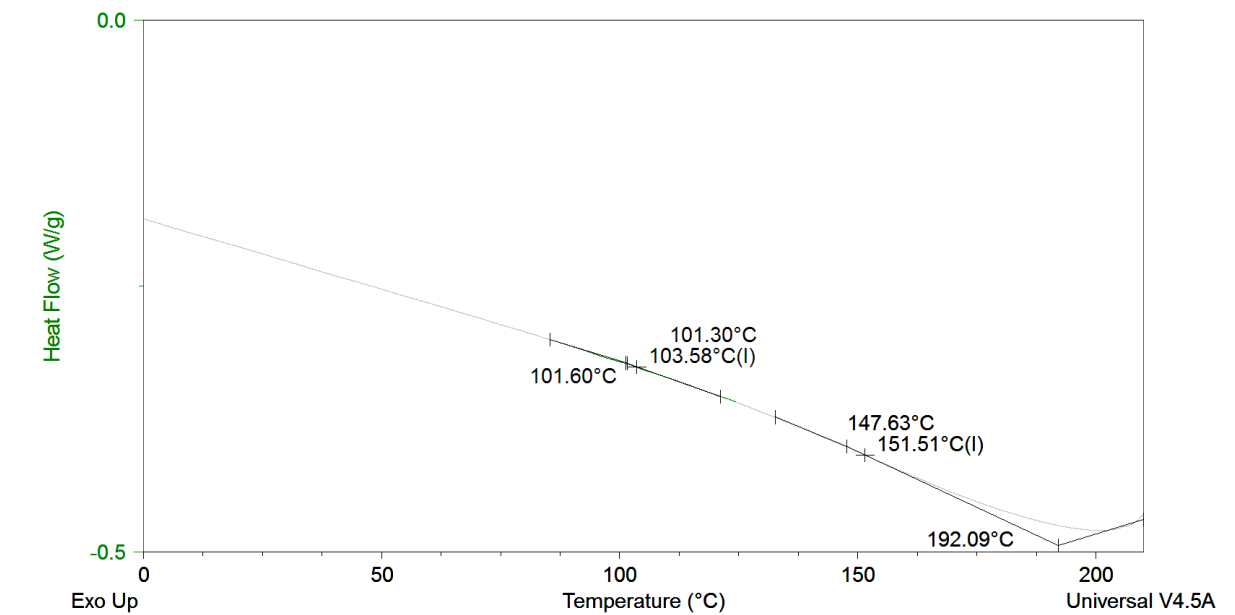
**Figura 16.** Termograma del hidrogel de quitosano con uno 25% de entrecruzamiento y cargado con 5X de Piriprofen.



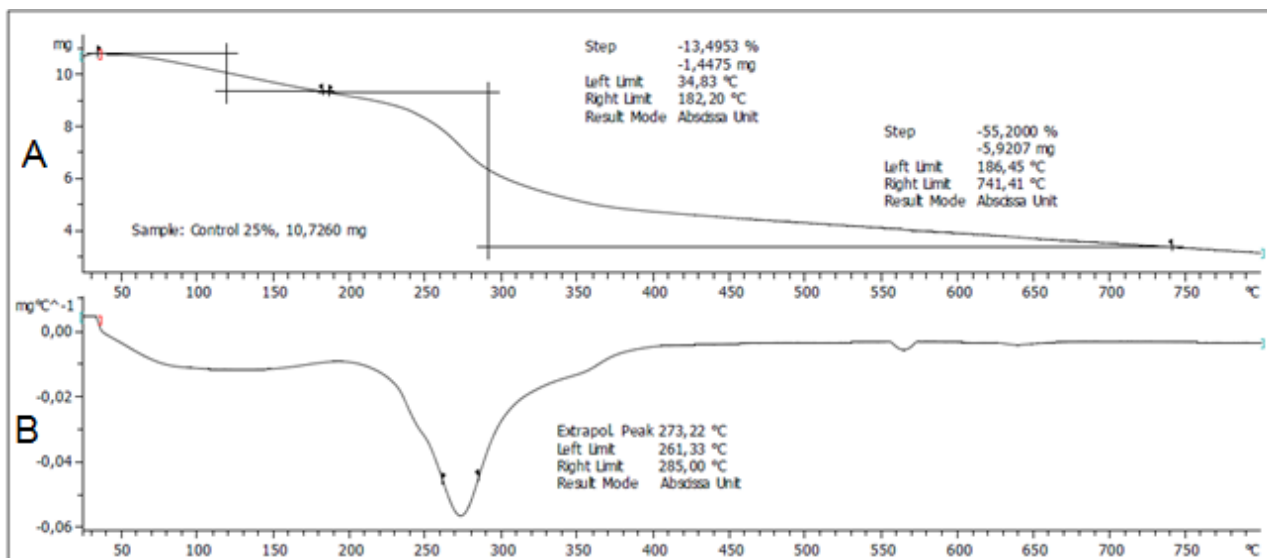
**Figura 17.** Termograma del hidrogel de quitosano con uno 25% de entrecruzamiento y cargado con 10X de Piriprofen.



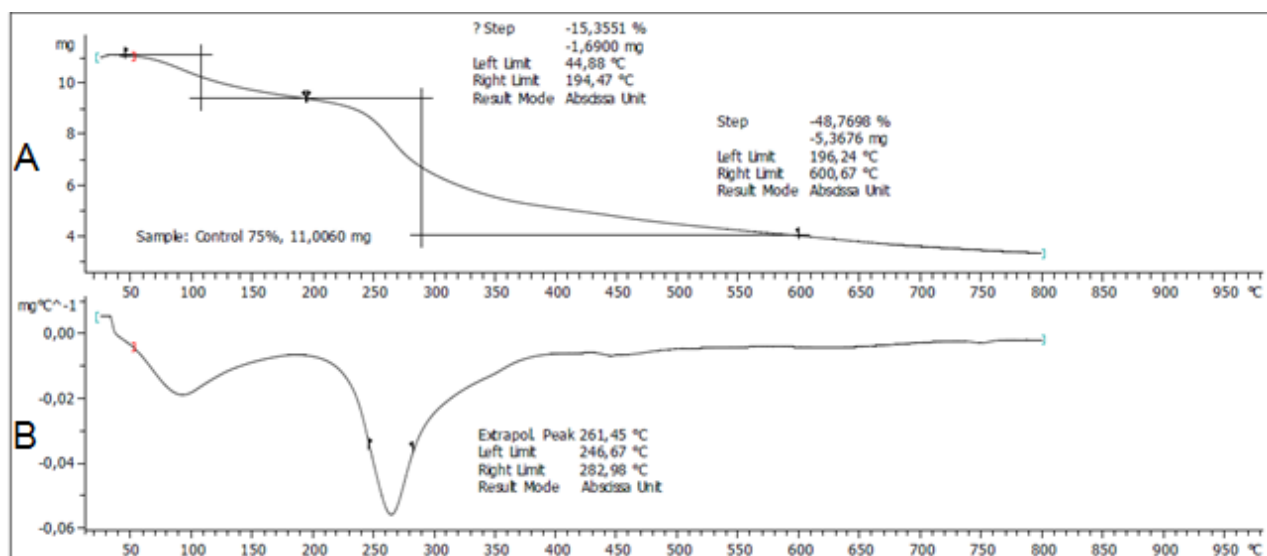
**Figura 18.** Termograma del hidrogel de quitosano con un 75% de entrecruzamiento y cargados con 5X de Piroproxifen.



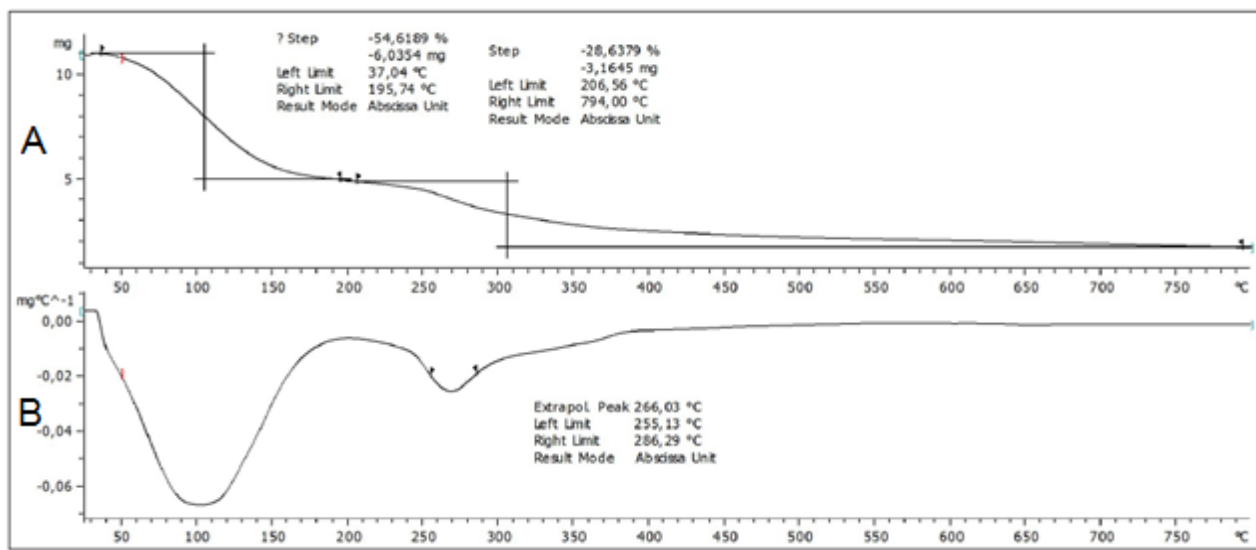
**Figura 19.** Termograma del hidrogel de quitosano con un 75% de entrecruzamiento y cargados con 10X de Piroproxifen.



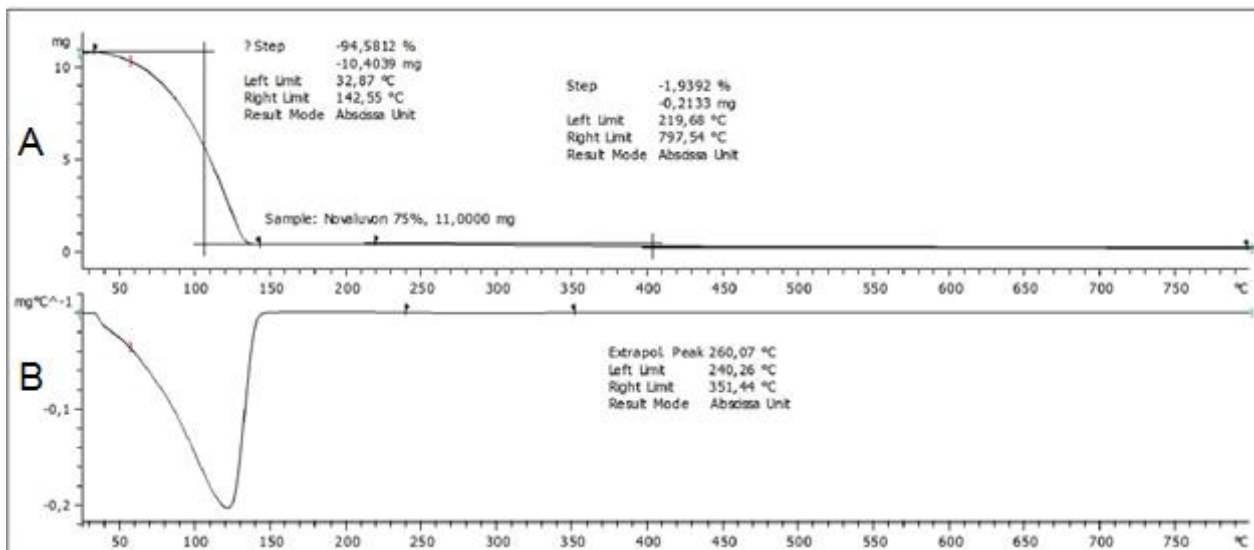
**Figura 20. a)** Termograma de TGA para hidrogel de quitosano con un 25% de entrecruzamiento **b)** primera derivada.



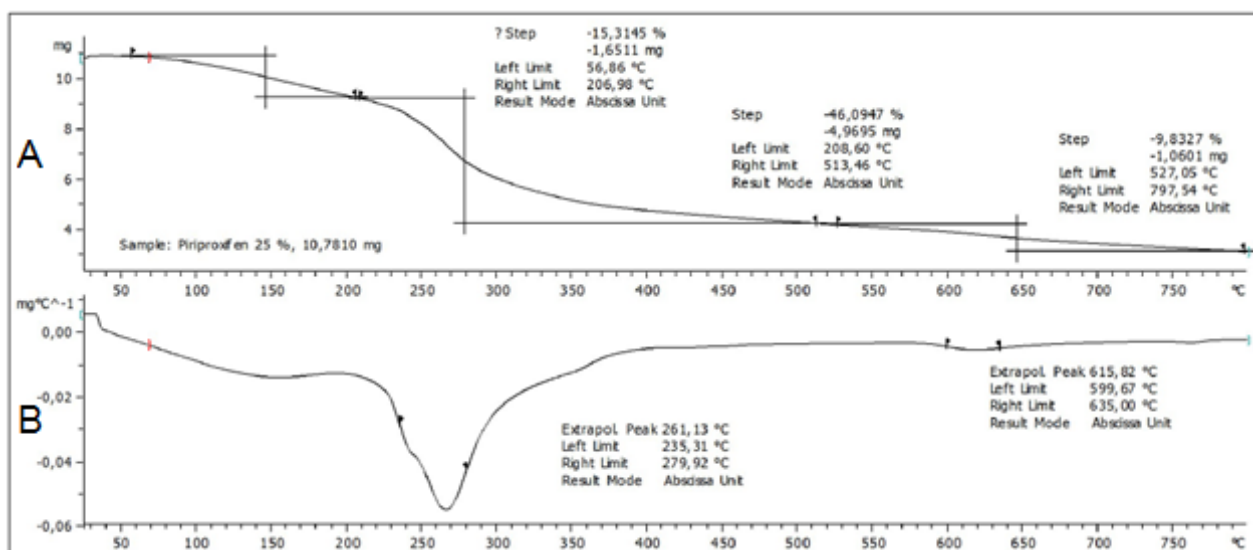
**Figura 21. a)** Termograma de TGA para hidrogel de quitosano con un 75% de entrecruzamiento. **b)**Primera derivada.



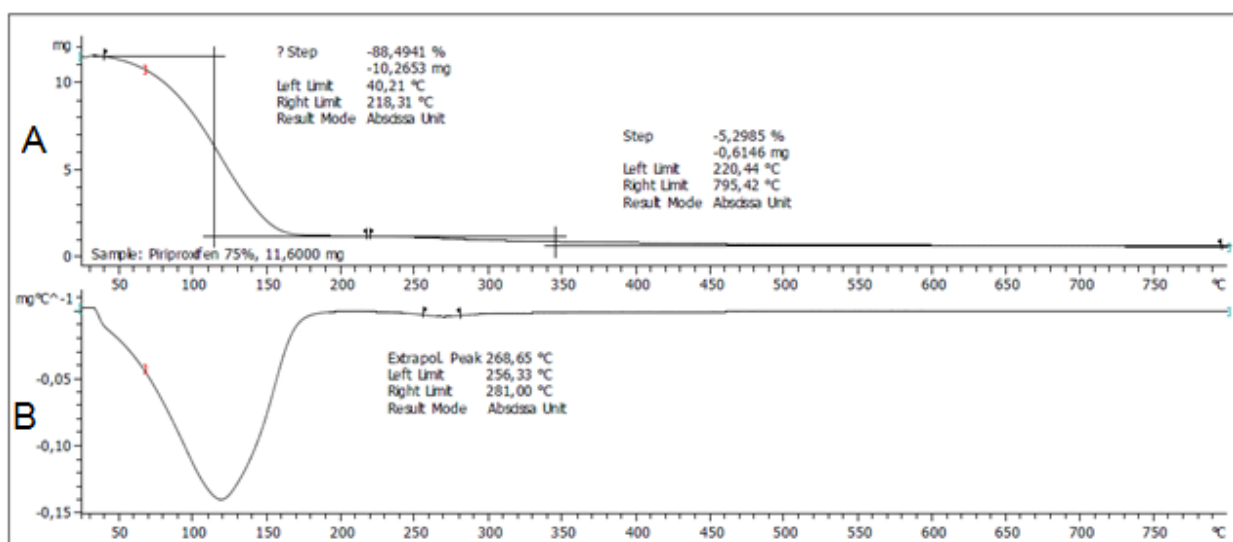
**Figura 22. a)** Termograma de TGA para hidrogel de quitosano con un 25% de entrecruzamiento y cargado con Novaluron. **b)** primera derivada.



**Figura 23. a)** Termograma de TGA para hidrogel de quitosano con un 75% de entrecruzamiento y cargado con Novaluron. **b)** primera derivada.



**Figura 28. a)** Termograma de TGA para hidrogel de quitosano con un 25% de entrecruzamiento y cargado con Piriproxifen. **b)** primera derivada



**Figura 24. a)** Termograma de TGA para hidrogel de quitosano con un 75% de entrecruzamiento y cargado con Piriproxifen. **b)** primera derivada.

**Tabla 7.**Datos obtenidos en el barrido de TGA

| Muestra                               | Peso Inicial (mg) | Primera pérdida de peso (mg) | Rango de temperatura (°C) | Segunda pérdida de peso (mg) | Rango de Temperatura (°C) | Temperatura máxima de velocidad de descomposición (°C) |
|---------------------------------------|-------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|--|
| <b>Control 25% entrecruzamiento</b>   | 10,73             | 1,45                         | 34,83-182,20              | 5,92                         | 182,20-741,41             | 273,22   |
| <b>Control 75% entrecruzamiento</b>   | 11,00             | 1,69                         | 44,88-194,47              | 5,37                         | 196,24-600,67             | 261,45   |
| <b>Novaluron 25% entrecruzamiento</b> | 11,00             | 6,04                         | 37,04-195,74              | 3,17                         | 206,56-794,00             | 266,03   |
| <b>Novaluron 75% entrecruzamiento</b> | 11,00             | 10,40                        | 32,87-142,55              | 0,21                         | 219,68-797,54             | 260,07   |
| <b>Piriproxifen 25% entrecruzado</b>  | 11,00             | 1,65                         | 56,86-206,98              | 6,03                         | 208,60-797,54             | 261,13   |
| <b>Piriproxifen 75% entrecruzado</b>  | 11,60             | 1,69                         | 40,21-218,31              | 5,37                         | 220,44-795,42             | 268,65   |



## 2.6 Discusión

### 2.6.1 Síntesis de hidrogeles de quitosano.

Para realizar la síntesis de hidrogeles de quitosano se utilizó una solución al 2% de ácido acético, el ambiente ácido permite solubilizar el quitosano por la protonación de la amina primaria presente en la estructura química de este biopolímero. Es importante resaltar que, aunque el Novaluron en su estructura química presenta una amida, ésta no se hidroliza a pesar de las condiciones, dado que el ácido acético tiene un pKa de 4,8 y es considerado un ácido débil. Adicionalmente, la solución se encontraba muy diluida. Por ende, es poco probable que en el medio esté disponible un ion hidronio ( $H^+$ ) que protone el oxígeno del carbonilo y genere una mayor susceptibilidad del carbono a un ataque nucleofílico por parte del agua.

En cuanto, al proceso de reticulación con glutaraldehído, las unidades desacetiladas de la molécula son las que participan en esta reacción. El grupo amino primario con un par de electrones libres, ataca nucleofílicamente el carbonilo del glutaraldehído, debido a la capacidad que tiene el oxígeno de aceptar cargas negativas, lo que forma una unión química tipo base de Schiff o imina (Perentena et al., 2015)

### 2.6.2 Cinética de liberación del larvicida Novaluron.

Inicialmente, el diseño experimental propuesto para determinar el perfil de liberación, consistía en poner los hidrogeles en agua destilada; sin embargo, se evidenció que el larvicida permanecía dentro de la matriz polimérica y no migraba hacia el medio exterior. Por lo que no fue posible cuantificar las concentraciones de larvicida liberadas a través del tiempo, lo que se atribuyó a la baja solubilidad que la molécula tiene en el agua ( $3 \mu\text{g/L}$ ) (Universidad de Hertfordshire, 2017). Por esta razón, se cambió el medio de liberación por una solución 60:40 metanol: agua; de esta manera se disminuye la constante dieléctrica de la solución y se da la migración del larvicida al exterior. Al disminuir la polaridad del medio se da la disgregación del larvicida y el medio solvata la molécula, lo que conlleva a un aumento en la solubilidad (Neira, et al., 1980).

Los datos obtenidos en el perfil de liberación del larvicida se graficaron y se calculó el área bajo la curva, con el fin de determinar la cantidad del compuesto activo liberado a través del tiempo y establecer cómo influye el grado de entrecruzamiento y la dosis del larvicida en la liberación. Esto se realizó por medio de un diseño factorial  $2^k$ , ya que hay dos factores y dos niveles; también se propusieron las respectivas hipótesis y se realizó un análisis de varianza.

Los resultados obtenidos establecen que hay una diferencia estadística significativa en el grado de entrecruzamiento, puesto que el valor  $p < \alpha$ . Sin embargo, no se encontró diferencia significativa con respecto a la dosis con la que se cargan los hidrogeles, ni se presenta interacción entre ambos factores, dado que el valor  $p > \alpha$ . Para comprobar lo descrito anteriormente se analizó la gráfica factorial de efectos principales (gráfica 7). En ésta se puede observar que la recta del grado de entrecruzamiento tiene una pendiente más marcada en comparación con la recta de dosis de larvicida, lo que indica que el primer parámetro tiene un mayor efecto en la cantidad de larvicida liberado a través del tiempo.

Adicionalmente, al analizar la gráfica 8 se observa que a un menor grado de entrecruzamiento hay una mayor área bajo la curva, lo que indica que hay una mayor liberación del larvicida. Teóricamente, los mecanismos de liberación del larvicida se ve afectada por factores como: la tasa de migración del agua a la matriz, la hidratación, la relajación de las cadenas poliméricas y la disolución del compuesto activo al exterior (Nakamatsu, 2002). La tasa de migración del agua a la matriz y la hidratación dependen principalmente del tamaño de poro del hidrogel, el cual disminuye al aumentar el grado de entrecruzamiento, lo que limita la entrada del medio (Martínez, 2016). Por su parte, la hidratación de la matriz ocurre por un fenómeno de hinchamiento que genera un cambio en el volumen y en el estado del hidrogel.

Los hidrogeles secos (xerogeles) se encuentran en un estado cristalino o vítreo en el cual sus moléculas permanecen inmóviles. Cuando el hidrogel entra en contacto con un medio acuoso se genera un cambio a un estado gomoso; en este nuevo estado las moléculas presentan un mayor movimiento y sus cadenas se relajan, lo que permite la difusión del compuesto activo al exterior (Martínez 2016). La velocidad con la que se relajan las cadenas es un delimitante de la tasa de liberación del activo, por lo tanto, a un mayor grado de entrecruzamiento menor es la velocidad de relajación de las cadenas del polímero, y por ende menor es la cantidad de larvicida liberado. Lo anterior se evidenció en el trabajo de grado, puesto que los hidrogeles con un 75% de entrecruzamiento liberaron una menor cantidad de larvicida al medio.

Por otra parte, no se encontró diferencia estadística significativa con respecto a la cantidad de larvicida con la que se cargaban las matrices poliméricas, esto se asocia a que los hidrogeles se comportan como un sistema de reservorio, el cual sigue una cinética de orden cero y este modelo matemático no tiene en cuenta la cantidad de principio activo encapsulado en la matriz (Pasqualone, 2016). En cuanto, a la relación entre los factores, se logró identificar que no existe interacción entre el grado de entrecruzamiento y la dosis con la que se cargaban los hidrogeles, esto se puede observar en la gráfica 8 puesto que las líneas se encuentran en paralelo y no presentan intercepción.

En cuanto, al perfil de liberación no se ajustó a los modelos matemáticos analizados (orden cero, orden uno y orden dos). Esto, puede ser debido a que el larvicida encapsulado en la matriz polimérica procede de una emulsión, la cual es una forma de liberación modificada. Por lo tanto, los modelos matemáticos analizados no se ajustan a esta condición, dado que se establecieron para estudiar sistemas que liberan compuestos puros y la matriz polimérica es la única encargada de la liberación modificada.

Sin embargo, el modelo cinético al que más ajusta el perfil de liberación es al de orden cero, es decir que la liberación del larvicida es independiente a la concentración. Al analizar la gráfica 2 se observa que en las primeras horas la concentración de larvicida liberada aumenta de forma constante, pero con el paso del tiempo se alcanza el equilibrio, el cual ocurre porque se agota la cantidad de larvicida en el interior de la matriz polimérica. Este permite plantear que los hidrogeles se comportan como un sistema reservorio donde el principio activo se encuentra en el núcleo, rodeado por membranas. Cuando la solución acuosa entra al hidrogel disuelve el larvicida y por medio del fenómeno de difusión migra al exterior siguiendo una cinética de orden cero (Martínez 2016).

### 2.6.3 Tiempo de equilibrio

Con base en los resultados obtenidos después de 45 días de experimentación, se determinó que la concentración del larvicida en el medio de liberación para los hidrogeles con 50X y 25% de entrecruzamiento es de 1,11 mg/L, mientras que para los hidrogeles con 100X y 25% de entrecruzamiento es de 5,16 mg/L. Cabe resaltar que estas concentraciones siguen siendo superiores a la dosis letal 99, la cual es de 0,55 mg/L. Lo que indica que los hidrogeles siguen siendo efectivo para combatir el vector *Aedes aegypti*.

### 2.6.4 Uniformidad del contenido

Los resultados obtenidos en la prueba de uniformidad de contenido indican que los hidrogeles con 50X y 25% de entrecruzamiento tiene una concentración promedio de 21,83 mg/L y un porcentaje de error de 20,615. Por otra parte, los hidrogeles con 50X y 75% de entrecruzamiento tienen un promedio de 26,86 mg/L de larvicida y un porcentaje de error del 2,33%. Errores que se atribuyen al proceso de fabricación y al analista.

Por otro lado, los hidrogeles con 100X y 25% de entrecruzamiento tienen una concentración promedio de 46,11 mg/L y un porcentaje de error del 16%. Asimismo, las matrices poliméricas con 100X y 75% de entrecruzamiento tienen en promedio 40,29 mg/L y un error del 26,75%. Estos errores se asocian a la presencia de un exudado grasoso que se encontró en los recipientes donde se almacenaban los hidrogeles, lo que indica que la emulsión se estaba saliendo de la matriz polimérica. Es importante resaltar que esto solo se evidencio en los hidrogeles con una concentración de 100X.

Lo anterior se relaciona con un efecto conocido como Burst, el cual tiene dos principales causas: la primera ocurre cuando los hidrogeles son almacenados durante algún tiempo antes de su uso y la segunda sucede cuando hay una saturación del compuesto activo. Ambas ocasionan una saturación de la membrana que rodea el depósito del larvicida y producen la migración del compuesto activo al exterior (Huang & Brazel, 2001) . Por lo tanto, se concluye que los hidrogeles con una concentración de 100X y un grado de entrecruzamiento de 25% y 75% sufrieron efecto Burst.

#### 2.6.5 Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Se realizó un estudio de las transiciones térmicas a diferentes muestras de hidrogeles de quitosano, con diferentes grados de entrecruzamiento y cargados con dos clases de larvicida: Novaluron y Piriproxifen.

En las figuras 14 y 15 se encuentran los termogramas de controles de quitosano con un 25% y 75% de entrecruzamiento. En estos se observan dos transiciones; el primero a una temperatura de 107,43°C para la matriz polimérica con 25% de entrecruzamiento y de 101,84°C para los hidrogeles con 75% de entrecruzamiento. La segunda transición se observa a 165,14°C y 164,93°C para cada hidrogel, respectivamente.

La primera transición se asocia a una señal endotérmica que se atribuye al agua ligada al polímero, la cual forma enlaces de hidrogeno con los grupos hidroxilo y los grupos amino libres de la molécula. Las interacciones con los grupos hidroxilos son mucho más fuertes, por ende, la energía necesaria para romper estos enlaces es mayor que la requerida para romper los enlaces formados con los grupos amino (Neto et al., 2005).

La segunda transición se considera la Tg de las muestras de quitosano, la cual está cerca de 165 °C, lo que concuerda con varios autores que plantean que la Tg de dicho polímero está en un valor cercano a los 170°C (Mucha & Pawlak, 2005). Al comparar los todos los termogramas, se concluye que la Tg del quitosano se encuentra en un rango entre los 150°C a 166°C. Cabe resaltar, que la Tg del quitosano no se ve afectada por la concentración de los larvicidas, debido a que en todos los termogramas analizados la transición se encuentra dentro del rango anteriormente mencionado, sin importar el tipo de larvicida. Adicionalmente se recomienda realizar DSC modulado para poder estudiar mejor la transición.

#### 2.6.6 Análisis termogravimétrico

En los termogramas de TGA (Figuras 24-29), se observan dos eventos de pérdida de masa. El primero comienza alrededor de los 34°C y finaliza cerca de los 200°C, éste se asocia a la pérdida de agua y a compuestos volátiles presentes en la muestra. El segundo evento empieza a los 200°C y finaliza a los 800°C y se atribuye a la degradación de la matriz polimérica de quitosano (Neto et al., 2005).

Los polisacáridos tienen gran afinidad por el agua, lo que les permite ser fácilmente hidratados (Neto et al., 2005). Con base en esto se analizó la tabla 7 y se observó que los controles presentan una pérdida de masa entre 1,45 y 1,69mg, es decir, entre 13,50 y 15,36% de la muestra total. En el caso de las muestras cargadas con el larvicida Novaluron, la pérdida de agua se encontró entre 6,04 y 10,40mg, en otras palabras, en un porcentaje entre 54,62 y 94,58%. Para las muestras cargadas con Piriproxifen la pérdida fue de un 15,31%. Estos datos dejan ver que la pérdida de agua varía en cada una de las muestras, lo que indica las diferencias en la capacidad que tiene cada sistema para retener agua debido probablemente al grado de entrecruzamiento y a la presencia del larvicida, más hidrofóbico que el hidrogel.

Es importante tener en cuenta la temperatura en la que ocurre esta pérdida de agua, puesto que temperaturas mayores a los 100°C indican que el agua está formando enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilos libres del quitosano. Sin embargo, cuando la deshidratación ocurre a temperaturas menores, quiere decir, que el agua está formando enlaces con los grupos amino, por lo tanto, la energía necesaria para romper estos enlaces es menor (Neto et al., 2005).

Por otra parte, a los 300°C ocurre la pirólisis que comienza con la división de los enlaces glicosídicos, posteriormente ocurre la despolimerización y descomposición de las unidades acetiladas y desacetiladas del polímero, lo que genera ácido acético, ácido butírico y ácidos grasos (Neto et al., 2005). Finalmente, a los 700°C ocurre la descomposición total del biopolímero (Escobar et al., 2013). En la tabla 7 se observa que la pérdida de masa para los controles es de 55,20 - 48,78% (5,92-5,37mg). Sin embargo, para los hidrogeles cargados con Novaluron la pérdida de masa es de 28,64 y 1,94% (3,17mg y 0,21mg) y para las matrices con Piriproxifen la pérdida es del 46,09% (6,03mg).

Teóricamente, se ha demostrado que la energía asociada a la degradación de la matriz polimérica es dependiente del nivel de desacetilización del quitosano (Peniche et al., 1993). Por ende, a un mayor grado de desacetilización la degradación ocurre a una temperatura menor. Lo anterior sucede porque el quitosano es menos estable termodinámicamente en comparación con la quitina (Escobar et al., 2013). El quitosano presenta en su estructura química un mayor número de grupos amino libres, por lo tanto, la degradación es más rápida que en caso de la quitina (Sánchez et al., 2007). El proveedor del quitosano utilizado en este proyecto de investigación Sigma-Aldrich declara que el porcentaje de desacetilización está entre un 75%-85%.

Otro aspecto a considerar es la temperatura máxima de velocidad de degradación, la cual disminuye a causa de dos factores: el primero es el porcentaje de desacetilización de la molécula y el segundo el grado de entrecruzamiento (Sánchez et al., 2007). Al analizar los datos de la tabla 7 se

observa que a la temperatura máxima de velocidad de degradación va disminuyendo conforme aumenta el grado de entrecruzamiento. Lo anterior ocurre porque el glutaraldehído afecta la estabilidad térmica del quitosano (Sánchez et al., 2007).

## 2.7 Conclusiones

El mejor medio para estudiar la liberación del larvicida Novaluron por espectroscopia UV/Vis es una solución 60:40 de metanol: agua, puesto que la constante dieléctrica de esta solución es menor que la del agua, permitiendo la migración del larvicida al medio.

A menor grado de entrecruzamiento mayor cantidad de larvicida liberado en el tiempo. Por otro lado, se determinó que la cantidad de larvicida en los hidrogeles no es un factor limitante de la liberación.

El perfil de liberación no se ajustó a los modelos cinéticos analizados, puesto que se trata de una forma de liberación modificada dentro de un sistema de liberación modificado, por lo tanto, los modelos matemáticos no cumplen con esta condición.

Los hidrogeles con una concentración de 100X y un grado de entrecruzamiento de 25% y 75% sufrieron efecto Burst.

Por medio de la técnica de calorimetría de barrido diferencial se determinó que la Tg del quitosano se encuentra en un rango entre los 150°C y 166°C y que no se ve afectada por la concentración de los larvicidas.

El quitosano tiene dos eventos de pérdida de masa. El primero se presenta entre 34°C y 200°C y se asocia a la pérdida de agua ligada. El segundo evento empieza los 200°C y finaliza a los 800°C y se atribuye a la degradación de la matriz polimérica de quitosano y la pérdida de compuestos volátiles.

## 2.8 Recomendaciones

Se recomienda, cargar los hidrogeles de quitosano con un estándar de Novaluron al 99% de pureza. De esta forma se podría determinar el modelo cinético que sigue el sistema matricial, puesto que con la emulsión del larvicida utilizada en los ensayos no es posible determinarlo.

Con el fin de extrapolar la cinética de liberación *IN VITRO* a condiciones *IN VIVO*, propongo plantear un método adecuado para cuantificar las muestras en un cromatógrafo de gases con captura de electrones. La molécula de Novaluron presenta grupos funcionales con alta densidad electrónica, lo que facilitaría la lectura en este equipo. Además, es importante resaltar que en comparación con el espectrofotómetro UV-Visible, el cromatógrafo de gases es un equipo con una mayor sensibilidad; por lo tanto, los resultados obtenidos tendrán una mayor exactitud y robustez.

## 2.9 Referencias

- Andreetta, H. A. (2003). Fármacos de Acción Prolongada: Mecanismos de Liberación. Usos de distintos modelos. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 22(4), 355–363.
- Aragon. (2009). Estudio Cinético De Liberación in Vitro En Un Biomaterial. *Rev. Iberoamer Polim*, 10(2), 119–130.
- Bisset, L. J. a. (2002). Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 54(3), 202–219.
- Cabezas L, C. W. (2017). *Distribución espacial del mosquito Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) en el área*. Bogota: Biomédica.
- Cadavid, J. M., Rúa, G., Campo, O., Bedoya, G., & Rojas, W. (2014). Cambios genéticos temporales y micro geográficos de *Aedes aegypti* en Medellín, Colombia. *Biomédica*, 35(1), 53–61. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i1.2343>
- C.G.T. Neto, J. G. (2005). *Thermal Analysis of Chitosan Based Networks*. ELSEVIER.
- Claudia Mora Aguirre. (2017). *Boletín por periodos epidemilógicos*. Cali: Secretaria de salud de la Alcaldía de Santiago de Cali.
- Cruz, R. R. (2002). *Estrategias para el control del dengue y del Aedes aegypti*. Cuba: OFICINA SANITARIA PANAMERICANA DE LA SALUD.
- Cutler, G. C., Scott-Dupree, C. D., Tolman, J. H., & Harris, C. R. (2006). Toxicity of the insect growth regulator novaluron to the non-target predatory bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). *Biological Control*, 38(2), 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.12.016>
- Dueñas Vera Sergio Ivan, O. C. (2016). *Dispositivos para la liberación controlada de fármacos*. Guanajuato: Revista de divulgación científica.
- Elek, N., Hoffman, R., Raviv, U., Resh, R., Ishaaya, I., & Magdassi, S. (2010). Novaluron nanoparticles: Formation and potential use in controlling agricultural insect pests. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 372(1–3), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.09.034>.



- Escobar-Sierra, D. M., Ossa-Orozco, C. P., Quintana-Antonio, M., & Ospina-Alexander, W. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. *Scientia et Technica Año*, *18(1)*, 260–266. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=89861734&lang=es&site=ehost-live>
- Silva, J. P. (2017). ESTUDIO DEL EFECTO Y DURACIÓN DEL LARVICIDA PIRIPROXIFÉN SOBRE EL DESARROLLO DE LAS LARVAS DEL MOSQUITO *Aedes aegypti* LIBERADO A PARTIR DE MATRICES POLIMÉRICAS DE QUITOSANO. ICESI.
- Fontoura, N. G., Bellinato, D. F., Valle, D., Bento, J., & Lima, P. (2012). The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil, *107(May)*, 387–395.
- Giraldo-calderón, G. I., Pérez, M., Morales, C. A., & Ocampo, C. B. (2008). Evaluación del triflumurón y la mezcla de *Bacillus thuringiensis* más *Bacillus sphaericus* para el control de las formas inmaduras de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* en sumideros en Cali , Colombia, 224–233.
- Gomez, C. X. (2017). Boletín Epidemiológico - Periodo I año 2017 2017.
- Gloria I. Giraldo, M. P. (2008). *Evaluación del triflumurón y la mezcla de Bacillus thuringiensis más Bacillus sphaericus para el control de las formas*. Cali: Biomédica.
- Grupo agrotecnología. (2017). *Terralia*. Obtenido de [http://www.terralia.com/vademecum\\_de\\_productos\\_fitosanitarios\\_y\\_nutricionales/view\\_composition?composition\\_id=17128](http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/view_composition?composition_id=17128)
- Huang, X., & Brazel, C. S. (2001). On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, *73(2–3)*, 121–136. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00248-6)
- Jagadish Roy, F. S. (2017). *Chitosan-Based Sustainable Textile Technology: Process, Mechanism, Innovation, and Safety*. INTECH.
- Jaramillo, A. (2016). Estudio de hidrogeles de quitosano para la liberación de un regulador de crecimiento de larvas de *Aedes aegypti*. (tesis de pregrado). Universidad Icesi, Santiago de Cali.
- Jyoti, Bhatia, K., Chauhan, K., Attri, C., & Seth, A. (2017). Improving stability and reusability of *Rhodococcus pyridinivorans* NIT-36 nitrilase by whole cell immobilization using chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, *103*, 8–15.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.012>

- Kaiwei Shi, L. L. (2016). *Chronic and acute risk assessment of human exposed to novaluron-bifenthrin mixture in cabbage*. Suiza: Environ Monit Assess.
- Kumar, M. N. (2004). *A review of chitin and chitosan applications*. India: Elsevier.
- Ladino, L. (2016). Liberación controlada del larvicida Novaluron para el control de mosquitos vectores de enfermedades tropicales a partir de hidrogeles de quitosano. (Tesis de pregrado). Universidad Icesi, Santiago de Cali.
- Lárez, C. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 4(2), 91–109.
- Lucha contra el dengue. (2016). *Organización mundial de la salud*. Obtenido de <http://www.who.int/denguecontrol/mosquito/es/>
- María Teresa Martínez Martínez . (2016). *Desarrollo y aplicaciones de hidrogeles para la administración y liberación modificada de fármacos* . Valencia: Universidad de Valencia.
- Maciel, W. G., Lopes, W. D. Z., Gomes, L. V. C., Cruz, B. C., Felippelli, G., Dos Santos, I. B., ... & Bastos, T. S. A. (2016). Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to fluazuron. Acevedo, J. C. F. (2015). *EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PROCESO DE COMPRESIÓN SOBRE LA CINÉTICA DE DISOLUCIÓN EN LAS TABLETAS DE FUROSEMIDA DE LIBERACIÓN INMEDIATA*. Universidad de la Sabana.
- Madrid, U. P. de. (2010). MÉTODOS DE ANÁLISIS TÉRMICO 1. Introducción, 1–32.
- Magalí Pasqualone. (2016). *Síntesis, caracterización y aplicaciones de copolímeros fumáricos en sistemas de liberación transdérmicos*. Universidad Nacional de La Plata. Retrieved from <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/57370>
- Martín, Agudo, Ariz, & Reyero. (2005). Formas farmacéuticas de liberación modificada y estereoisómeros ¿Nos aportan algo en la práctica clínica? *Boletín de Información Farmacoterapéutica de Navarra*, 13, 1–10.
- Mucha, M., & Pawlak, A. (2005). Thermal analysis of chitosan and its blends. *Thermochemica Acta*, 427(1–2), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2004.08.014>

- Nakamatsu, J. (2002). Matrices Poliméricas para Liberación Controlada de Sustancias Activas, 13–23.
- Naranjo, D. P., & Beier, J. C. (2016). Entomological Impact and Current Perceptions of Novaluron and Temephos against the *Aedes Aegypti* (Skuse) Vector of Dengue, Chikungunya and Zika Arboviruses in a Coastal Town in Ecuador. *Vector Biology Journal*, 1(1), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2473-4810.1000102>
- Neira, M. C., Jiménez, F., & Ponce de León, L. F. (1980). Influencia De La Constante Dielectrica En La Solubilizacion Del Diazepam. *Revista Colombiana de Ciencias Quimico-Farmacéuticas*, 3(1), 37–61.
- Neto, C. G. T., Giacometti, J. A., Job, A. E., Ferreira, F. C., Fonseca, J. L. C., & Pereira, M. R. (2005a). Thermal analysis of chitosan based networks. *Carbohydrate Polymers*, 62(2), 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.02.022>
- Neto, C. G. T., Giacometti, J. A., Job, A. E., Ferreira, F. C., Fonseca, J. L. C., & Pereira, M. R. (2005b). Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. *Carbohydrate Polymers*, 62(2), 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.02.022>
- Organizacion Mundial de la salud. (2016). Obtenido de <http://www.who.int/denguecontrol/mosquito/es/>
- Organización mundial de la salud. (Febrero de 2016). Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/es/>
- Peniche-Covas, C., Argüelles-Monal, W., & San Román, J. (1993). A kinetic study of the thermal degradation of chitosan and a mercaptan derivative of chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, 39(1), 21–28. [https://doi.org/10.1016/0141-3910\(93\)90120-8](https://doi.org/10.1016/0141-3910(93)90120-8)
- Perentena, L., Gonzáles, C., Celis, B., Valbuena, A., & Colina, M. (2015). Síntesis de bases de schiff derivadas del quitosano por reacción con p-dimetilaminobenzaldehído y 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 16(1), 1–27.
- Pitts-Singer, T. L., & Barbour, J. D. (2017). Effects of residual novaluron on reproduction in alfalfa leafcutting bees, *Megachile rotundata* F. (Megachilidae). *Pest Management Science*, 73(1), 153–159. <https://doi.org/10.1002/ps.4356>
- Ramirez, A., & Astudillo, L. R. De. (2016). MATERIALES POLIMEROS DE TIPO HIDROGELES: REVISIÓN SOBRE SU CARACTERIZACIÓN MEDIANTE FTIR , DSC , MEB , MET POLYMERS MATERIALS TYPE

HYDROGELS : REVIEW OF THEIR CHARACTERIZATION BY FTIR , DSC , MEB , MET Artículo Regular ( ASAP ). *Revista Latinoamericana de Metalurgia Y Materiales*, 36(2), 108–130.

Rocha, F. R. P., & Teixeira, L. S. G. (2004). Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Quimica Nova*, 27(5), 807–812. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500021>

Rodríguez Cruz, R. (2002). Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 54(3), 189–201. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0375-07602002000300004&lng=es&nrm=iso&tlng=es%5Cnhttp://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602002000300004&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0375-07602002000300004&lng=es&nrm=iso&tlng=es%5Cnhttp://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602002000300004&script=sci_arttext)

Sáez, V., Hern, E., & Angulo, L. S. (2004). Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5(1), 55–70.

Sánchez-Duarte, R. G., Martínez-Macías, M. del R., Correa-Murrieta, M. A., Saldívar-Cabral, J., Sánchez-Machado, D. I., & López-Cervantes, J. (2017). Síntesis de hidrogeles de quitosano a partir de cáscara de camarón para ensayos de adsorción de cobre. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(Special Issue 1), 93–98. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.esp02.09>

Sánchez, A., Sibaja, M., Vega-Baudrit, J., & Madrigal, S. (2007). Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) con potenciales aplicaciones biomédicas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 8(4), 241–267.

Sandoval, P. A., Baena, Y., Aragón, M., Rosas, J. E., & Ponce D 'león, L. F. (2008). Mecanismos generales de cesión de principios activos a partir de matrices monolíticas hidrofílicas preparadas con éteres de celulosa. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm*, 37(2), 105–121.

Santos, S., Amela, C., Sierra, M. J., Suarez, B., Sánchez, A., & Simón, F. (2013). Evaluación del riesgo de introducción y circulación del virus de dengue en España. *Centro de Coordinación de Alertas Y Emergencias Sanitarias (CCAES), Madrid.*, 41.

Suñé, J. (2000). Nuevas Aportaciones Galénicas a las Formas de Administración. *Ferrer Grupo, Barcelona, España*, 41–47. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Nuevas+aportaciones+galénicas+a+las+formas+de+administración#0>

Vélez, I. D., Quiñones, M. L., Suárez, M., Olano, V., Murcia, L. M., Correa, E.,

... Morales, A. (1998). Presencia de *Aedes albopictus* en Leticia, Amazonas, Colombia. *Biomédica*, 18(3), 192. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v18i3.990>

Virginia Sáez, E. H. (2002). Sistemas de liberación controlada de medicamentos. *Iberoamericana de Polímeros*, 20.

Viseras, M. (2008). *Desarrollo galénico de preparados obtenidos por interacción del ácido 5-amino salicílico con halloysita*.

Wanjun, T., Cunxin, W., & Donghua, C. (2005). Kinetic studies on the pyrolysis of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, 87(3), 389–394. <https://doi.org/10.1016/j.polyimdegradstab.2004.08.006>

## ANEXOS

**Anexo 1.** Cálculo para la síntesis de hidrogeles de quitosano.

- **Preparación de solución de ácido acético glacial al 2%**

$$\frac{2\text{mL ácido acético glacial}}{100\text{mL de solución}} * 100 = \text{solución de ácido acético 2\%}$$

Esta solución fue preparada en un matraz aforado de 100mL y como solvente se utilizó agua destilada.

- **Preparación de solución de quitosano al 3%**

$$\frac{3\text{g de quitosano}}{100\text{mL de solución ácido acético 2\%}} * 100 = \text{solución quitosano 3\%}$$

Esta solución fue preparada en un vaso precipitado de 400mL y como solvente se usó la solución de ácido acético glacial al 2% preparada anteriormente.

- **Preparación de solución de glutaraldehído 2,5% a partir de solución de glutaraldehído 25%.**

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$25\% * V_1 = 2,5\% * 50\text{mL}$$

$$V_1 = \frac{2,5\% * 50\text{mL}}{25\%}$$

$$V_1 = 5\text{mL}$$

Esta solución fue preparada en un matraz aforado de 50mL empleando como solvente agua destilada.

- **Determinación de la densidad de la solución de glutaraldehído 2,5%**

En trabajos anteriores se determinó la densidad para esta solución el valor obtenido fue de 1,006g/mL a una temperatura de 21°C (Ladino, 2016).

- **Cálculos para la obtención de matrices poliméricas cargadas con Novaluron**

- Volumen del molde

El molde en donde se realiza la síntesis de los hidrogeles tiene un largo de 12 cm un ancho de 12 cm y un alto de 0,5 cm, por lo tanto tiene un volumen total de 72 cm<sup>3</sup>

$$\begin{aligned} \text{Volumen total} &= 1,2\text{cm}^2 * 0,5\text{cm} * 100 = 72\text{cm}^3 \\ &= 72\text{mL de solución para llenarlo completamente} \end{aligned}$$

- Moles de quitosano

$$\begin{aligned} 72 \text{ mL sln de quitosano} &\times \frac{3 \text{ g quitosano}}{100 \text{ mL ácido acético}} \times \frac{1 \text{ mol quitosano}}{170,376 \text{ g quitosano}} \\ &= 1,268 \times 10^{-2} \text{ moles de quitosano} \end{aligned}$$

Es importante tener en cuenta, que el proveedor especifica que el porcentaje de desacetilización del quitosano es del 80%.

$$\begin{aligned} \text{Moles quitosano desacetilado} &= 1,268 \times 10^{-2} \text{ moles quitosano} * 0,80 \\ &= 1,014 \times 10^{-2} \text{ mol quitosano desacetilado} \end{aligned}$$

A partir, de las moles de quitosano desacetilado se realiza el cálculo de las moles de glutaraldehído necesarias para realizar hidrogeles con 25% de entrecruzamiento

$$\begin{aligned} 1,014 \times 10^{-2} \text{ moles de desacetiladas} &\times \frac{1 \text{ mol de glutaraldehído}}{2 \text{ moles desacetiladas}} \times 0,25 \\ &= 1,268 \times 10^{-3} \text{ moles de glutaraldehído} \end{aligned}$$

**Tabla 8.** Moles de glutaraldehído según porcentaje de entrecruzamiento

| Entrecruzamiento | Moles de glutaraldehído |
|------------------|-------------------------|
| 25%              | 1,268x10 <sup>-3</sup>  |
| 75%              | 3,803x10 <sup>-3</sup>  |

Haciendo uso de la densidad del glutaraldehído previamente hallada, se calcula el volumen necesario para obtener un 25% de entrecruzamiento.

$$1,268 \times 10^{-3} \text{ moles de gluta} \times \frac{100 \text{ g gluta}}{1 \text{ mol gluta}} \times \frac{100 \text{ g solución}}{2,5 \text{ g gluta}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1,006 \text{ g gluta}} = 5,07 \text{ mL de glutaraldehído}$$

**Tabla 9.** Volumen de glutaraldehído según porcentaje de entrecruzamiento.

| Entrecruzamiento | Volumen de solución de glutaraldehído al 2,5% |
|------------------|---|
| 25%              | 5,07 mL                                       |
| 75%              | 15,12 mL                                      |

Ahora, se procede a calcular la cantidad necesaria de Novaluron para que cada hidrogel contenga la concentración requerida.

- Volumen de 100 ml para cada ensayo

$$\text{Dosis letal } 99 = 0,55 \text{ mg/L} \times 0,1 \text{ L} = 0,055 \text{ mg/L}$$

Se calcula el volumen de un cubo de hidrogel que resulta de un molde, con el fin de asegurar la concentración necesaria.

$$V = l \times l \times l$$

$$V = 1,0 \text{ cm} \times 1,0 \text{ cm} \times 0,5 \text{ cm} = 0,5 \text{ cm}^3 \frac{1 \text{ mL}}{1 \text{ cm}^3} = 0,5 \text{ mL}$$

Después, de obtenido el volumen de un hidrogel de quitosano y asumiendo que tiene una concentración de 0,55 ppm se procede a calcular la cantidad de larvicida por cada mililitro.

$$\text{Cantidad de larvicida} = \frac{5,5 \times 10^{-2} \text{ mg}}{0,5 \text{ mL}} = 0,11 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

Posteriormente, se procede a calcular la cantidad de larvicida por mililitro, asumiendo que la concentración es de 0,55 ppm y se tiene en cuenta que la emulsión presenta una concentración de 5%. Novaluron.

$$\text{Cantidad de Nova} = 0,11 \frac{\text{mg nova}}{\text{mL sln}} \times 100 \text{ ml sln quitosano} \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \frac{100 \text{ ml emulsion}}{5 \text{ g Nova}} = 0,22 \text{ mL de emulsión.}$$



Este cálculo se repite para cada una de las concentraciones obteniendo los resultados presentes en la tabla 10.

**Tabla 10.** Volumen de larvicida según la concentración requerida.

| <b>Concentración</b><br><b>(X=0,55ppm)</b> | <b>Emulsión de larvicida en (ml)</b> |
|--|--------------------------------------|
| <b>50X</b>                                 | 11ml                                 |
| <b>100X</b>                                | 22ml                                 |

## **Anexo 2.**Reacción de entrecruzamiento del gluraldehído con el quitosano<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> Tomado de (Silva, 2017)

