

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Formulación y caracterización de ionogeles celulósicos
reforzados con quitosano**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María del Mar Villar Chavero

Directores

Juan Carlos Domínguez Toribio
M^a Virginia Alonso Rubio

Madrid

Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Ingeniería Química y de Materiales



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

TESIS DOCTORAL

**Formulación y Caracterización de Ionogeles Celulósicos
Reforzados con Quitosano**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN EL PROGRAMA DE
DOCTORADO DE INGENIERÍA QUÍMICA PRESENTADA POR

María del Mar Villar Chavero

Tutor:

Juan Carlos Domínguez Toribio

Directores:

Juan Carlos Domínguez Toribio y M^a Virginia Alonso Rubio

Madrid, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. María del Mar Villar Chavero,
estudiante en el Programa de Doctorado en Ingeniería Química,
de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Formulación y Caracterización de Ionogel Celulósicos Reforzados con Quitosano

y dirigida por: el Prof. Juan Carlos Domínguez Toribio y la Prof. M^a Virginia Alonso Rubio

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 10 de septiembre de 2019

Fdo.: M^{ra} del Mar Villar Chavero

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

No hay otros mundos, pero sí hay otros ojos.

(Mar antiguo - El último de la fila)

Agradecimientos

En primer lugar, mi más profunda gratitud a mis directores de tesis la Prof. Virginia Alonso y el Prof. Juan Carlos Domínguez por su paciencia, ayuda, dedicación, experiencia y consejos. Pero, de todo lo que me han aportado, tengo que resaltar la confianza que han depositado en mí para llevar a cabo esta tesis doctoral, ya que me han proporcionado libertad para innovar y, así, disfrutar de estos años de investigación. También, me gustaría agradecer al Prof. Francisco Rodríguez la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación.

Este trabajo no habría sido posible sin la financiación del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades a través de los proyectos CTQ2011-23533 y CTQ2017-88623-R. Así como de la Comunidad de Madrid a través del proyecto S2013/MAE-2800.

Agradecer a la Prof. Mercedes Oliet y al Prof. Julián García la ayuda y el apoyo recibido durante estos años, así como al Prof. Eduardo Díez y al Prof. José Manuel Toledo. Mención aparte merece el Prof. Rubén Miranda por el apoyo científico en la primera etapa de la tesis con su conocimiento de los quitosanos.

En los primeros años tuve la gran suerte de tener de compañeros de laboratorio a Pablo y Ana. Muchísimas gracias por hacer que los días fueran tan divertidos, por el apoyo, las risas y ser unos compañeros y amigos maravillosos. Echo de menos los "labohits", espero que los recuperemos pronto. También, más recientemente, tuve la oportunidad de compartir mi trabajo con una gran aprendiz, Cynthia. Tus ganas de investigar, de ayudarme, e incluso de organizarme me han ayudado mucho en esta tesis doctoral. Cynthia, nunca pierdas tu interés por la ciencia, vales mucho.

Mi gratitud a un grupo maravilloso de investigadores y compañeros que han posibilitado que cada día fuera mejor que el anterior: Marcos, Emilio, Noemí, Miguel A., Isa, Antonio, Miguel A. A., Joselu, Laura, Noelia, Sandra, Isra, Jhired y Borja. Pablo N. quiero agradecerte tu visión de la investigación y el apoyo que he recibido con tus consejos. Si de alguien he aprendido a levantarme y seguir es de Tamara, que me ha enseñado que hay que ser fuerte y aprender de todo lo malo para convertirlo en bueno. Gracias a Javi y Gonzalo porque han sido mi fuente de alegría, sois unos compañeros indispensables en cualquier laboratorio. Matt quiero agradecerte tu atención siempre que me hacía falta, tú también me caes mejor de lo que piensas. Patricio, gracias por enseñarme algo nuevo cada día. Mención especial se merece Jesús, mi gran técnico, compañero y amigo. Muchas gracias por el apoyo que me has dado todos estos años, por enseñarme a empezar el día con una sonrisa, por ayudarme con las limpiezas eternas y por tus ganas de seguir aprendiendo que son, sin duda, pegadizas.

Esta tesis tampoco habría sido posible sin el apoyo que he recibido de mi grupo Dradis. Gracias por obligarme a evadirme de vez en cuando, escucharme y preocuparos. En especial, quiero agradecer a Elena M. sus consejos, también permitirme que me desahogara siempre que lo he necesitado y por entenderme. No me puedo olvidar de Anush y de Óscar por toda su ayuda y comprensión. Así como me gustaría agradecer a Alicia R. su apoyo y su positividad arrolladora.

No tengo palabras suficientes para expresar mi gratitud a mis doctoras, amigas y compañeras, Victoria y Cristina. Gracias a vosotras esta tesis ha salido adelante, porque sin vuestro eterno apoyo, iniciativas, ayuda, ideas y buen humor esto no hubiese sido posible. Como dice un refrán, “los amigos ciertos son los probados con hechos” y los hechos me los habéis más que demostrado. Sois espectaculares.

Gracias a mi familia por estar siempre que la he necesitado, por su comprensión, por cuidarme y por entenderme en todo momento. En especial a mis padres, porque se lo merecen todo. Alicia quiero agradecerme que siempre conviertas un problema en una solución, eres una persona extraordinaria que siempre me ha ayudado. También quiero agradecer a Isabel y Alfonso su apoyo durante todo este tiempo.

Por último, quiero dar las gracias a Alfonso por sus consejos, siempre con una sonrisa ha sabido qué decirme y cómo ayudarme. Tu paciencia y tu apoyo incondicional me han ayudado en todo momento. Te agradezco todo el esfuerzo que has hecho para aguantarme en este periodo y la labor que haces en mi vida, eres una gran fuente de motivación e inspiración.



ÍNDICE

Índice

Resumen /Abstract	1
Capítulo 1. Alcance y objetivos de la tesis doctoral.....	11
Capítulo 2. Materiales tipo gel con líquidos iónicos y el quitosano como refuerzo	17
2.1. Definición y clasificación de geles	19
2.2. Ionogeles y bionogeles celulósicos.....	21
2.2.1. <i>La celulosa como fase dispersa.....</i>	21
2.2.2. <i>El líquido iónico como fase líquida</i>	22
2.2.2.1. <i>Líquido iónico cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio.....</i>	24
2.2.2.2. <i>Líquidos iónicos basados en aminoácido y colina</i>	24
2.2.3. <i>Formación del ionogel celulósico</i>	26
2.2.4. <i>Aplicaciones del ionogel celulósico.....</i>	26
2.3. Caracterización mecánica de geles.....	29
2.3.1. <i>Conceptos básicos de reología de materiales viscoelásticos.....</i>	29
2.3.2. <i>Espectro reológico de geles</i>	32
2.4. El quitosano.....	33
2.4.1. <i>Estructura química y propiedades.....</i>	34
2.4.2. <i>Métodos de obtención del quitosano y caracterización.....</i>	35
2.4.2.1. <i>Determinación del grado de desacetilación.....</i>	36
2.4.2.2. <i>Determinación del peso molecular promedio.....</i>	38
2.4.3. <i>Aplicaciones del quitosano</i>	39
2.4.4. <i>Refuerzo de materiales con quitosano</i>	41
Capítulo 3. Planteamiento de la tesis doctoral.....	43

Capítulo 4. Grado de desacetilación del quitosano	49
4.1. Planteamiento experimental, materiales y reactivos	51
4.2. Procedimiento experimental para la determinación del grado de desacetilación	52
4.2.1. Resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN)	52
4.2.2. Análisis termogravimétrico (TGA)	53
4.2.3. Espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).....	54
4.3. Resultados experimentales y discusión.....	54
4.3.1. Grado de desacetilación por ^1H RMN	55
4.3.2. Grado de desacetilación por TGA.....	57
4.3.3. Grado de desacetilación por FTIR	58
4.3.4. Selección de la técnica para la determinación del grado de desacetilación	59
Capítulo 5. Obtención y caracterización de los quitosanos utilizados como refuerzo....	61
5.1. Planteamiento experimental, materiales y reactivos	63
5.2. Procedimiento para la obtención y caracterización de los quitosanos	64
5.2.1. Obtención de quitosano a partir de quitina.....	65
5.2.2. Caracterización de los quitosanos obtenidos.....	66
5.2.2.1. Difracción de rayos-X	66
5.2.2.2. FTIR a diferentes temperaturas	67
5.2.2.3. Análisis termogravimétrico.....	67
5.2.2.4. Viscosimetría.....	67
5.3. Resultados experimentales y discusión.....	67
5.3.1. Relación entre la concentración de NaOH y el DD	68
5.3.2. Cristalinidad de los quitosanos obtenidos	70
5.3.3. Comportamiento térmico de los quitosanos obtenidos.....	71
5.3.3.1. Estructura química determinada por FTIR a diferentes temperaturas	72
5.3.3.2. Estabilidad térmica	73
5.3.4. Peso molecular promedio viscoso.....	75
Capítulo 6. Ionogeles celulósicos convencionales reforzados con quitosano.....	77
6.1. Planteamiento experimental y materiales.....	79
6.2. Procedimiento para la formulación y caracterización de los ionogeles celulósicos convencionales reforzados con quitosano	80
6.2.1. Formulación de los ionogeles.....	80
6.2.2. Caracterización de los ionogeles	81
6.2.2.1. Reología.....	81
6.2.2.2. Análisis térmico	81
6.3. Resultados y discusión de la caracterización de los ionogeles formulados	82

6.3.1. Comportamiento viscoelástico	82
6.3.1.1. Estabilidad frente al tiempo y región lineal viscoelástica	82
6.3.1.2. Espectro reológico.....	83
6.3.1.3. Mecanismo de formación del ionogel reforzado	85
6.3.2. Comportamiento térmico.....	86
6.3.3. Selección del DD del quitosano para el refuerzo de ionogel celulósicos	87
Capítulo 7. Bionogel celulósicos reforzados con quitosano	89
7.1. Planteamiento experimental y materiales.....	91
7.2. Procedimiento para la formulación de los bionogel celulósicos	93
7.2.1. Procedimiento para el "screening" de líquidos iónicos de aminoácido y colina	93
7.2.2. Formulación de los bionogel celulósicos sin refuerzo de quitosano	93
7.2.3. Formulación de los bionogel celulósicos con refuerzo de quitosano	94
7.3. Caracterización de los bionogel celulósicos formulados	95
7.3.1. Caracterización reológica	95
7.3.2. Espectroscopía infrarroja de reflectancia total atenuada con Transformada de Fourier.....	96
7.3.3. Análisis antimicrobiano	96
7.4. Bionogel celulósicos sin reforzar	96
7.4.1. "Screening" de los líquidos iónicos de aminoácido y colina.....	97
7.4.2. Comportamiento viscoelástico y mecanismo de formación del bionogel celulósico	98
7.4.3. Selección del porcentaje de celulosa en el bionogel.....	103
7.5. Bionogel celulósicos reforzados con quitosano	104
7.5.1. Comportamiento viscoelástico y mecanismo de formación del bionogel reforzado...	104
7.5.2. Capacidad antimicrobiana.....	108
7.5.3. Selección de la carga de quitosano en el bionogel reforzado	110
Capítulo 8. Conclusiones	113
Capítulo 9. Nomenclatura.....	119
Capítulo 10. Bibliografía.....	125
Anexo I. Estructuras químicas de los líquidos iónicos ChAAIL utilizados en el screening	141
Anexo II. Publicaciones.....	145

Índice de figuras

Figura 2.1. Clasificación de los geles en función de las fases y las interacciones entre ellas (Marr y Marr, 2016)	20
Figura 2.2. Estructura química de la celulosa	21
Figura 2.3. Propiedades de los líquidos iónicos según su generación (Hough <i>et al.</i> , 2007; de María, 2012; Egorova <i>et al.</i> , 2017)	22
Figura 2.4. Ejemplos de aplicaciones en diferentes sectores de los líquidos iónicos	23
Figura 2.5. Estructura química del BmimCl.....	24
Figura 2.6. Estructura química del lisinato de colina (ChLys).....	25
Figura 2.7. Disolución y mecanismo de formación del ionogel celulósico con BmimCl	26
Figura 2.8. Aplicaciones de los ionogeles.....	27
Figura 2.9. Clasificación de los materiales de acuerdo con su comportamiento reológico	30
Figura 2.10. Esquema del funcionamiento de un reómetro en un ensayo oscilatorio (Barnes, 2000).....	31
Figura 2.11. Espectro reológico genérico (Barnes, 2000).....	32
Figura 2.12. Espectro reológico de (a) un gel físico débil, y (b) de un gel físico fuerte	33
Figura 2.13. Estructura química del quitosano	34
Figura 2.14. Estructura química de la quitina/ quitosano en función del DD.....	34
Figura 2.15. Propiedades del quitosano y su relación con el DD y M_w	35
Figura 2.16. Métodos de obtención del quitosano.....	35
Figura 3.1. Esquema por bloques de la tesis doctoral.....	45
Figura 3.2. Planteamiento de la tesis doctoral	46
Figura 4.1. Planteamiento experimental para la selección de la técnica y el método para la obtención del DD.....	51
Figura 4.2. Espectro de ^1H RMN del quitosano comercial a) 27°C y b) 70°C	56
Figura 4.3. Curva TGA y DTG del quitosano de referencia.....	57

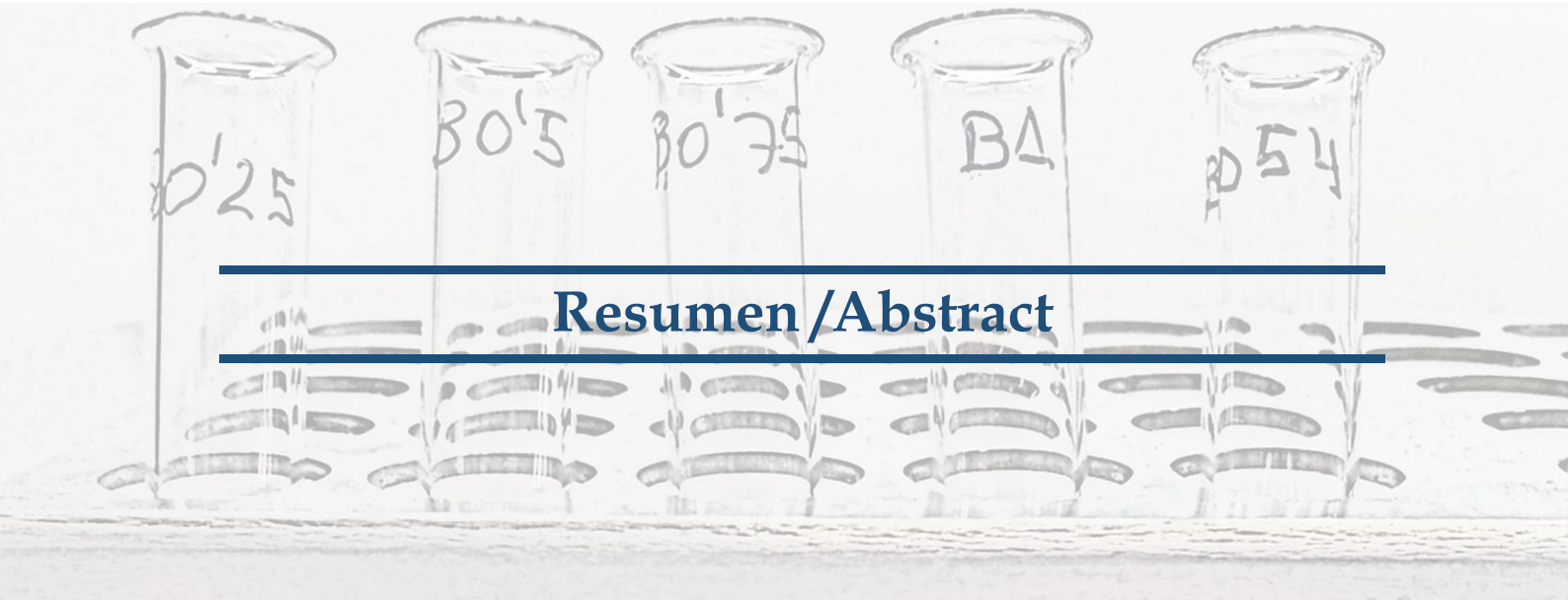
Figura 4.4. (a) Espectro FTIR del quitosano comercial de referencia y (b) ampliación del espectro entre 1240 y 1520 cm^{-1}	59
Figura 5.1. Planteamiento experimental de la obtención de quitosanos para los refuerzos de materiales	64
Figura 5.2. Procedimiento para la obtención de quitosanos mediante la desacetilación de la quitina	65
Figura 5.3. Espectros de infrarrojo de los quitosanos obtenidos con concentraciones de NaOH entre 37 y 52 %	68
Figura 5.4. Representación del DD de los quitosanos obtenidos frente a la concentración de NaOH	69
Figura 5.5. Difractogramas de los quitosanos C54, C62, C69, C77 y C84	70
Figura 5.6. Espectros FTIR de las muestras C54, C62, C69, C77 y C84 (a) temperatura ambiente, (b) 290 °C, (c) 340 °C y (d) 500 °C	72
Figura 5.7. Curvas TGA y DTG medidas con una rampa de calefacción de 10 °C/min de los quitosanos (a) C54 y (b) C84	74
Figura 6.1. Planteamiento experimental de la formulación de ionogeles celulósicos convencionales reforzados con quitosano	80
Figura 6.2. Esquema del proceso de formulación del ionogel celulósico convencional reforzado con quitosano con diferentes DD	80
Figura 6.3. Espectros reológicos de los ionogeles reforzados. (a) Módulo elástico (G') y (b) módulo viscoso (G'')	83
Figura 6.4. Viscosidad compleja (η^*) de los ionogeles convencionales reforzados	85
Figura 6.5. Esquema del proceso de formación del ionogel celulósico convencional reforzado con quitosano	86
Figura 6.6. (a) Termogramas DSC y (b) curvas derivadas de DSC de los ionogeles celulósicos reforzados formulados	86
Figura 6.7. Valores de los módulos elástico y viscoso, y la fuerza de gel, en Pa, de los ionogeles celulósicos reforzados	87
Figura 7.1. Planteamiento experimental para la formulación y caracterización de bionogeles celulósicos con y sin refuerzo de quitosano	92
Figura 7.2. Esquema del proceso de formulación de los bionogeles celulósicos	94
Figura 7.3. Esquema del proceso de formulación de los bionogeles celulósicos reforzados con quitosano	94
Figura 7.4. Esquema del proceso de análisis antimicrobiano de los bionogeles	96
Figura 7.5. Espectros reológicos de los bionogeles celulósicos formulados a 3 días (a y b) y a 7 días (b y c) de postgelificación	100
Figura 7.6. Viscosidad compleja de los bionogeles celulósicos formulados a a) 3 días de postgelificación y b) 7 días de postgelificación	102
Figura 7.7. Mecanismo de formación de los bionogeles celulósicos	102
Figura 7.8. FTIR/ATR de la celulosa, el ChLys y de los bionogeles celulósicos formulados	103
Figura 7.9. Valores de los módulos G' y G'' , y del G_0 , en Pa, de los bionogeles celulósicos formulados. () : indica el tiempo de postgelificación	104
Figura 7.10. Espectros reológicos de los bionogeles celulósicos reforzados formulados. (a) Módulo elástico, G' , y (b) módulo viscoso, G''	106

Figura 7.11. Viscosidad compleja de los bionogel celulósicos reforzados con quitosano.....	107
Figura 7.12. Mecanismo de formación del bionogel celulósico reforzado con quitosano	108
Figura 7.13. Fotografías de los ensayos antimicrobianos de los bionogel celulósicos reforzados con quitosano y de su matriz frente a las bacterias (a) <i>S. aureus</i> y (b) <i>E. coli</i>	108
Figura 7.14. Diámetros de inhibición obtenidos del estudio de capacidad antibacteriana de los bionogel celulósicos reforzados con quitosano.....	109
Figura 7.15. Valores de los módulos G' y G'' , y del G_0 , en Pa, de los bionogel celulósicos reforzados.	110

Índice de tablas

Tabla 2.1. Parámetros estudiados en la disolución de celulosa en el cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio (Pinkert <i>et al.</i> , 2009; Isik <i>et al.</i> , 2014).....	24
Tabla 2.2. Técnicas y procedimientos de caracterización del quitosano y la quitina para la determinación del DD (Belgacem y Gandini, 2008; Kasai, 2009)	37
Tabla 2.3. Aplicaciones del quitosano (Aranaz <i>et al.</i> , 2009; Hamed <i>et al.</i> , 2016; Muxika <i>et al.</i> , 2017). 40	
Tabla 2.4. Ejemplos de materiales reforzados con quitosano	41
Tabla 4.1. Reactivos empleados en la selección de la técnica y método de determinación del DD ..	52
Tabla 4.2. Condiciones de operación para el ensayo TGA para la determinación del DD (Alonso <i>et al.</i> , 1983).....	53
Tabla 4.3. Valores de las integrales de las señales para la determinación del DD del quitosano comercial mediante ^1H RMN y sus resultados.....	57
Tabla 4.4. Resultados de la pérdida de masa en base seca para el proceso de desacetilación y valor del DD del quitosano de referencia mediante TGA.....	58
Tabla 4.5. Absorbancias de las bandas de 1320 y 1420 cm^{-1} y valor del DD del quitosano de referencia calculado mediante FTIR.....	59
Tabla 4.6. DD del quitosano comercial calculado con las diferentes técnicas propuestas.....	60
Tabla 4.7. Evaluación de las técnicas de ^1H RMN a 70 °C y FTIR para la determinación de DD del quitosano de referencia.....	60
Tabla 5.1. Reactivos empleados en la obtención y caracterización de los quitosanos utilizados como refuerzos	64
Tabla 5.2. Condiciones de la reacción de desacetilación de la quitina	66
Tabla 5.3. Absorbancias medias para la determinación del DD, y grado de desacetilación de los quitosanos obtenidos con concentraciones de NaOH entre 37 y 52 %.....	69
Tabla 5.4. Valores de la concentración de NaOH para obtener los quitosanos con distintos DD para el refuerzo de ionogeles y bionogeles, absorbancias medias para el cálculo del DD y valores de éste junto con el DD objetivo para cada caso	70

Tabla 5.5. Índices CrI para las muestras de quitosano C54, C62, C69, C77 y C84	71
Tabla 5.6. Valores del $T_{25\%}$ a diferentes rampas de calentamiento para las muestras C54, C62, C69, C77 y C84	74
Tabla 5.7. Pesos moleculares viscosos promedios (M_v) y parámetros de la Ecuación 5.2 de las muestras de quitosano obtenidas en función de su DD	75
Tabla 6.1. Condiciones de los ensayos reológicos para caracterizar los ionogel celulosicos convencionales reforzados con quitosano	81
Tabla 6.2. Valores de γ_c de los ionogel celulosicos reforzados formulados	82
Tabla 6.3. Valores de los parámetros del ajuste potencial del módulo elástico y relación G'/G'' media de los espectros de los ionogel formulados	84
Tabla 7.1. ChAAIL utilizados en el <i>screening</i> para la selección del líquido iónico de base biológica	92
Tabla 7.2. Condiciones de los ensayos reológicos para caracterizar los bionogel celulosicos	95
Tabla 7.3. Observaciones del <i>screening</i> de los líquidos iónicos de ChAAIL utilizados	98
Tabla 7.4. Valores de γ_c de los bionogel celulosicos formulados	99
Tabla 7.5. Parámetros del ajuste potencial del módulo elástico y relación G'/G'' para 4 Hz de los espectros de los bionogel celulosicos formulados.....	101
Tabla 7.6. Valores de γ_c de los bionogel celulosicos reforzados formulados	105
Tabla 7.7. Valores de los parámetros del ajuste potencial del módulo elástico y relación G'/G'' para 4 Hz de los espectros de los bionogel celulosicos formulados	106
Tabla 7.8. Propiedades reológicas de hidrogeles de uso médico/farmacológico	111



Resumen / Abstract

Resumen

Título

Formulación y caracterización de ionogel celulosicos reforzados con quitosano.

Introducción

Actualmente, los biocomposites, materiales compuestos de al menos un material natural, son una alternativa interesante a otros composites menos respetuosos con el medioambiente. En este sentido, están emergiendo un amplio abanico de materiales que están adquiriendo gran interés en el área médico/farmacológica. Entre éstos se encuentran los ionogel celulosicos. Un ionogel celulosico es un material tipo gel compuesto por un líquido iónico como fase líquida dispersa y celulosa como fase sólida continua. Los líquidos iónicos son sales orgánicas cuya temperatura de fusión es menor a 100 °C. La variabilidad de las propiedades de estas sales es muy elevada debido a la posibilidad de elección del catión-anión. Entre estas propiedades se encuentra la capacidad que presentan algunos líquidos iónicos de disolver la celulosa, convirtiéndolos en una alternativa a los disolventes convencionales. La celulosa es un biopolímero con propiedades biodegradables, biocompatibles, de alta resistencia mecánica, etc. que la hacen muy interesante para la formulación de materiales ecológicos y económicos.

Los líquidos iónicos utilizados para la formulación de ionogel celulosicos para su uso en el sector médico/farmacológico son comúnmente de segunda generación. Sin embargo, debido a la baja biocompatibilidad y biodegradabilidad de estos líquidos iónicos, en este trabajo se plantea la posibilidad de formular nuevos ionogel celulosicos con mejores propiedades (bionogel) en relación con los ionogel convencionales. Los bionogel, término acuñado en la presente tesis, son

aquellos ionogel en los que el líquido iónico utilizado para su formulación proviene de una base biológica.

Para reforzar los ionogel y los bionogel y mejorar así sus propiedades mecánicas y biológicas, se ha propuesto utilizar el quitosano. Una de las propiedades fisicoquímicas más importante del quitosano es el grado de desacetilación (DD). Éste se define como el porcentaje de unidades glucosamina presentes en la cadena de polímero. Este polímero presenta propiedades biológicas de gran interés. Además, como proviene de residuos de la industria de la alimentación, con dicho refuerzo se consigue una valorización del quitosano.

Objetivos

El objetivo principal de la tesis doctoral consiste en la formulación y la caracterización de ionogel y bionogel reforzados con quitosano. La matriz de estos materiales presenta la integración de las propiedades del líquido iónico y la celulosa. Por otra parte, el refuerzo de quitosano facilita el uso de estos materiales en el sector médico/farmacológico. La principal novedad de la tesis reside tanto en la formulación de ionogel reforzados con quitosano, como en la formulación de bionogel con y sin refuerzo de quitosano. Éstos últimos presentan una gran proyección en el sector médico/farmacológico, posibilitando la elaboración de nuevos materiales tipo gel biocompatibles y biodegradables.

Resultados y conclusiones

La tesis doctoral se ha estructurado en cuatro bloques: selección de la técnica para la determinación del grado de desacetilación del quitosano, la obtención y caracterización de los quitosanos utilizados como refuerzo, la formulación y caracterización de ionogel celulósicos convencionales reforzados con quitosano y, por último, la formulación y caracterización de bionogel celulósicos con y sin refuerzo con quitosano.

En el primer bloque se estudiaron tres técnicas analíticas para la determinación del DD del quitosano, resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN), termogravimetría y espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR). De todas las técnicas estudiadas, las que mejores resultados presentaron fueron el ensayo de ^1H RMN a 70 °C y el análisis mediante FTIR. Finalmente, se seleccionó como la más adecuada el FTIR debido a que la muestra no requería un tratamiento previo, las cantidades utilizadas en el ensayo fueron muy pequeñas y el tiempo invertido en la realización de dicho fue corto.

El segundo bloque consistió en el desarrollo de un procedimiento para la elaboración de quitosanos con un cierto DD y la caracterización de éstos. Primero, se determinó una relación entre la concentración de NaOH del proceso de obtención del quitosano y el DD del mismo.

Posteriormente, se obtuvieron los quitosanos con un DD del 54, 62, 69, 77 y 84 % para reforzar los ionogel y bionogel. Estos quitosanos se caracterizaron mediante difracción de rayos-X, FTIR a diferentes temperaturas, análisis termogravimétrico y viscosimetría. El quitosano con un DD de 54 % (C54) presentó la mayor estabilidad térmica, hecho que se demostró con los resultados de la cristalinidad. Los pesos moleculares promedios viscosos determinados para los quitosanos obtenidos presentaron un orden de magnitud similar de 10^6 g/mol.

En el tercer bloque se formularon ionogel celulósicos con el líquido iónico cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio, reforzados con quitosano con diferentes DD (54, 62, 69, 77 y 84 %) en la misma carga (3 %). Los resultados reológicos obtenidos mostraron que las propiedades reológicas dependían del DD del quitosano. El ionogel celulósico reforzado con un quitosano con un DD del 84 % (Gel84) fue el material que presentó mejores propiedades reológicas, es decir, mayores módulos elástico y viscoso, viscosidad compleja y fuerza de gel. Se determinó que el mecanismo de formación de los ionogel reforzados es por interacciones físicas de tipo puente de hidrógeno entre la matriz y el refuerzo, siendo la cantidad de éstas mayor cuando se incrementa el DD del quitosano. Se seleccionó el Gel84 debido a sus buenas propiedades reológicas. Por ello, el DD del quitosano seleccionado para el refuerzo de ionogel fue de 84 %.

En el cuarto bloque se formularon bionogel celulósicos con una concentración de celulosa del 0,5; 1; 1,5 y 2 %. El líquido iónico utilizado para dicha formulación fue el lisinato de colina, elegido mediante un *screening* con otros líquidos iónicos biodegradables. Los resultados de la caracterización reológica mostraron una dependencia de las propiedades reológicas con la concentración de celulosa utilizada, siendo el bionogel BC2 (2 % de celulosa) el ionogel con mejores propiedades. El mecanismo de formación de los bionogel celulósicos fueron por interacciones físicas de puentes de hidrógeno entre sus compuestos. Así pues, se seleccionó el bionogel BC2, conformando la matriz de los bionogel celulósicos reforzados con quitosano. A continuación, se formularon los bionogel celulósicos reforzados con quitosano con las cargas de 0,25; 0,5; 0,75 y 1 %. De forma general, al aumentar la carga de quitosano, las propiedades reológicas de los bionogel reforzados aumentaron. Estas propiedades fueron mejores que las que presentó la matriz. El mecanismo de formación de estos materiales fue similar al de los ionogel convencionales reforzados con quitosano. Los bionogel reforzados mostraron una buena capacidad antibacteriana. Por último, el bionogel B1 (1 % quitosano) fue el bionogel reforzado seleccionado debido a que mostró las mejores propiedades reológicas, siendo prometedor para su uso en la industria médica/farmacéutica.

Abstract

Title

Formulation and characterization of cellulosic ionogels reinforced with chitosan.

Introduction

Nowadays, biocomposites, materials composed of at least one natural material, are an interesting alternative to other less environmentally friendly composites. In this sense, different emerging materials are acquiring great interest in the medical/pharmaceutical area, such as cellulosic ionogels. Cellulose ionogel is a gel-like material composed of an ionic liquid as a liquid disperse phase and cellulose as a solid continuous phase. Ionic liquids are organic salts whose melting temperature is less than 100 °C. The variability of the properties of these salts is very high due to extensive possibilities of combination cation-anion. The ability of some ionic liquids to dissolve cellulose is among these properties, making them an alternative to conventional solvents. Cellulose is a biodegradable, biocompatible, high mechanical strength biopolymer, with properties highly interesting for the formulation of eco-friendly and low-cost materials.

Ionic liquids used for the cellulosic ionogels formulation for use in the medical/pharmaceutical sector are commonly second-generation. However, because of the low biocompatibility and biodegradability of these ionic liquids, the possibility of formulating new cellulosic ionogels with better properties (bionogels) in relation to conventional ionogels is considered in this work. Bionogels are ionogels in which the ionic liquid used for its formulation is obtained from a biological source.

Chitosan has been proposed as a suitable reinforcement of the formulation of the ionogels and bionogels due to it improve their mechanical and biological properties. One of the most important physicochemical properties of chitosan is the degree of deacetylation (DD). It is defined as the percentage of glucosamine units present in the polymer chain. This polymer has biological properties of great interest. In addition, as it is a byproduct of the food industry; using chitosan as a reinforcement is an interesting way of valorizing it.

Objectives

The main objective of this PhD thesis is the formulation and characterization of chitosan reinforced ionogels and bionogels. The matrix of these materials presents the integration of the properties of both ionic liquid and cellulose. On the other hand, the reinforcement of chitosan facilitates the use of these materials in the medical/pharmacological sector. The main novelty of this thesis lies in the formulation of ionogels reinforced with chitosan, as well as in the formulation of bionogels with and without chitosan reinforcement. The latter have a great projection in the medical/pharmacological sector, making possible the elaboration biocompatible and biodegradable gels.

Results and conclusions

This PhD thesis has been organized in four lines: selection of the technique for the determination of the degree of deacetylation of chitosan, the obtaining and characterization of chitosan used as reinforcement, the formulation and characterization of conventional cellulosic ionogels reinforced with chitosan and, finally, the formulation and characterization of cellulosic bionogels without and with chitosan reinforcement.

In the first line three analytical techniques were studied, proton magnetic resonance (^1H NMR), thermogravimetry and Fourier Transform infrared spectroscopy (FTIR), for the determination of chitosan DD. The best results were obtained by ^1H NMR assay at 70 °C and FTIR analysis. However, FTIR was selected as the most suitable because the sample did not require prior treatment, the quantities used in the assay were very small, as well as the running time.

The second line consisted of obtaining a procedure for obtaining chitosan with a specific DD and their characterization. First, the relationship between the concentration of NaOH in the process of obtaining chitosan and its DD was determined. Then, chitosan was obtained with a DD of 54, 62, 69, 77 and 84% to reinforce ionogels and bionogels. These chitosans were characterized by X-ray diffraction, FTIR at different temperatures, thermogravimetric analysis and viscosimetry. Chitosan with a DD of 54 % (C54) presented the highest thermal stability, which agreed with the crystallinity results. The average viscous molecular weights determined for the obtained chitosan presented a similar order of magnitude of 10^6 g/mol.

In the third line, cellulosic ionogels were formulated using the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium chloride, reinforced with chitosan with different DD (54, 62, 69, 77 and 84 %) at the same loading (3 %). Rheological results showed that the rheological properties of the ionogels depended on the DD of the chitosan. The cellulosic ionogel reinforced with chitosan with a DD of 84 % (Gel84) presented the best rheological properties, i.e. higher elastic and loss moduli, complex viscosity and gel strength. The formation mechanism of reinforced ionogels was through physical interactions by hydrogen bonds between the matrix and the reinforcement, being the quantity of these bonds greater when the DD of the chitosan was increased. Gel84 was selected due to its good rheological properties. Therefore, the DD of the chitosan selected for the ionogel reinforcement was 84%.

Finally, in the fourth line, cellulosic bionogels were formulated with a cellulose concentration of 0.5; 1; 1.5 and 2 %. The ionic liquid used for this formulation was choline lysinate, chosen from a screening based on the cellulose dissolution capability of the biodegradable ionic liquids. The results showed a dependence of the rheological properties with the cellulose concentration, being the BC2 material (2% cellulose) the ionogel with better properties. The mechanism of formation of cellulosic bionogels was by physical interactions (hydrogen bonds) among their compounds. Therefore, the BC2 bionogel was selected, forming the matrix of cellulosic bionogels reinforced with chitosan. The cellulosic bionogels reinforced with chitosan were formulated with 0.25; 0.5; 0.75 and 1 % loadings. In general, as the chitosan load increased, the rheological properties of the reinforced bionogels were improved. These properties were better than those presented by the matrix. The mechanism of formation of these materials was similar to that of conventional ionogels reinforced with chitosan. All reinforced bionogels showed good antibacterial capacity. Finally, the bionogel B1 (1% chitosan) was the one selected because it showed the best rheological properties, being very promising for its use in the medical/pharmaceutical industry.



Capítulo 1
Alcance y objetivos de la tesis doctoral

1. Alcance y objetivos de la tesis doctoral

La búsqueda de nuevos materiales que no generen impacto en el medioambiente actualmente se encuentra en el foco activo de la investigación debido en parte al gran problema generado por la contaminación de los plásticos (Chae y An, 2018; Monteiro *et al.*, 2018). En este sentido, se buscan nuevos materiales que presenten la capacidad de ser biodegradables. Los hidrogeles han emergido como la alternativa biodegradable a las matrices poliméricas menos respetuosas con el medioambiente dentro del sector médico/farmacológico. Además, los hidrogeles aportan diferentes propiedades atractivas en este sector como son, por ejemplo, la biocompatibilidad o la inocuidad. Sin embargo, muchos autores han manifestado que estos materiales presentan propiedades mecánicas bajas (Hoffman, 2012; Li *et al.*, 2018a). En este contexto se originó el planteamiento de la presente tesis doctoral, cuyo epicentro científico se basa en la búsqueda de nuevos materiales de tipo gel para su uso en el sector médico/farmacológico con buenas propiedades mecánicas. Esta tesis se enmarca en la línea de investigación “Desarrollo y caracterización de biomateriales con líquidos iónicos” perteneciente al Grupo de Investigación que dirige el Prof. Francisco Rodríguez Somolinos que lleva por título, “Desarrollo de Procesos y Productos de Bajo Impacto Ambiental” de la Universidad Complutense de Madrid.

En concreto, el objetivo principal de la tesis consiste en la formulación y caracterización de nuevos materiales celulósicos de tipo gel biodegradables e inocuos (bionogeles) reforzados con quitosano. La matriz de estos materiales, formada por un líquido iónico y celulosa, presenta la integración de las propiedades de estos dos compuestos. Además, al incorporarse un líquido iónico al material, su valor añadido se ve incrementado, ya que éste se utiliza de forma habitual como disolvente orgánico. Por otra parte, el refuerzo de quitosano facilita el uso de estos materiales en el

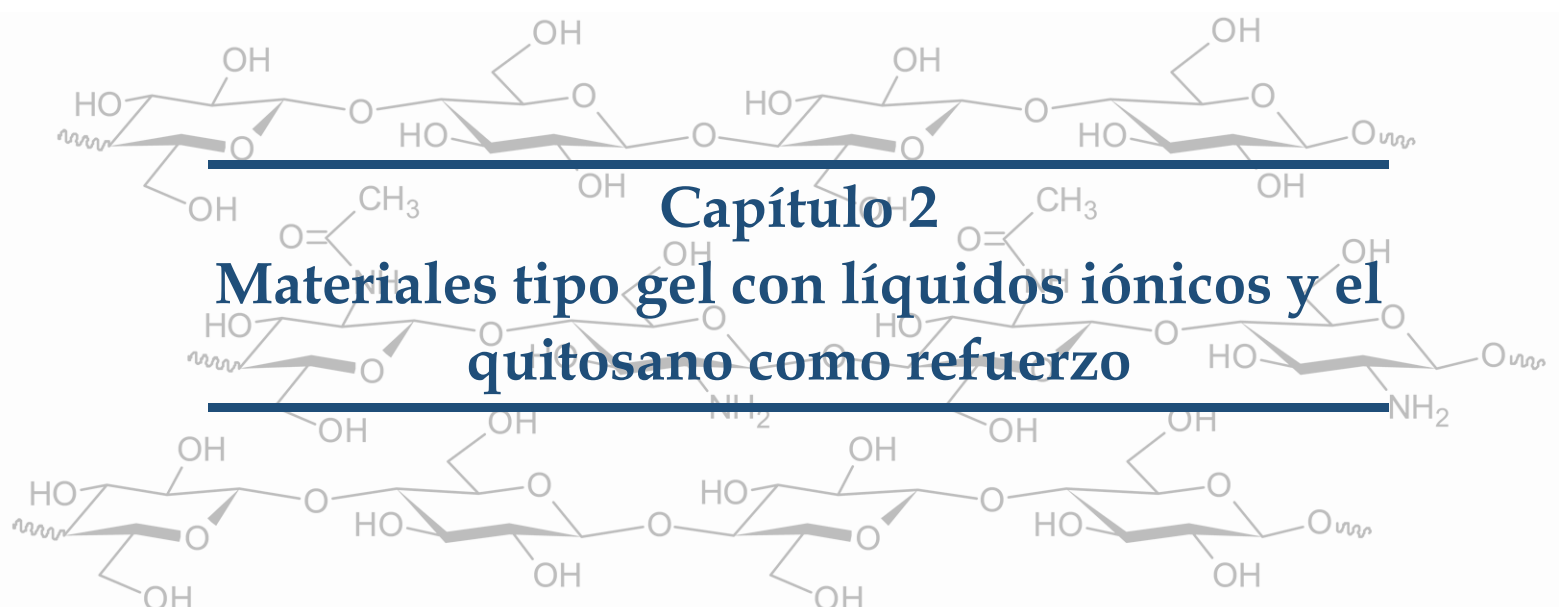
sector médico/farmacológico, pues aporta propiedades biológicas de alto potencial para estos sectores. Los diferentes quitosanos utilizados en este trabajo han sido obtenidos en el marco de la presente tesis doctoral para poder controlar las principales propiedades fisicoquímicas de los mismos: el grado de desacetilación (DD) y el peso molecular promedio. De esta forma, se puede evaluar la influencia que tienen estos quitosanos en las propiedades mecánicas de los ionogel y bionogel formulados. La caracterización mecánica de los materiales desarrollados se ha determinado mediante reología, técnica que permite, además, poder evaluar la conformación de la estructura interna del material.

Para alcanzar el objetivo principal de la tesis doctoral, se han planteado diferentes objetivos específicos relacionados tanto con la matriz, como con el refuerzo:

- Objetivo específico 1 (relacionado con el refuerzo): seleccionar la técnica más conveniente para la determinación del grado de desacetilación de un quitosano comercial.
- Objetivo específico 2 (relacionado con el refuerzo): obtener y caracterizar los quitosanos con un DD entre un 54 y 84 % para utilizarlos como refuerzo de los ionogel y bionogel.
- Objetivo específico 3 (relacionado con el refuerzo): conocer la influencia del DD del quitosano en ionogel convencionales reforzados y seleccionar el DD del refuerzo para, posteriormente, utilizarlo en la formulación de bionogel reforzados.
- Objetivo específico 4 (relacionado con la matriz): seleccionar el líquido iónico de base biológica más adecuado para la formulación de bionogel.
- Objetivo específico 5 (relacionado con la matriz): obtener bionogel con diferentes concentraciones de celulosa sin reforzar para conocer la influencia de ésta en la matriz. Seleccionar el porcentaje de celulosa para la formulación de bionogel reforzados con quitosano.
- Objetivo específico 6 (relacionado con el refuerzo): desarrollar bionogel celulósicos reforzados con diferentes cargas de quitosano y seleccionar aquél que presente mejores propiedades reológicas para su uso potencial en el sector médico/farmacológico.

Los objetivos específicos se han planteado de forma que, primero, se pueda conocer la influencia del DD del refuerzo en las propiedades reológicas de un ionogel convencional celulósico para, posteriormente, formular bionogel con un líquido iónico respetuoso con el medioambiente y biocompatible y poder reforzarlos con quitosano para conseguir las mejores propiedades mecánicas y biológicas.

La originalidad de esta tesis doctoral reside tanto en la formulación de ionogeles celulósicos reforzados con quitosano, como en la formulación de bionogeles, es decir, nuevos materiales de tipo gel biodegradables e inoos, con buenas propiedades reológicas y biológicas con un gran potencial en el sector médico/farmacológico. Este hecho hace que estos materiales tengan una gran proyección en diferentes líneas de investigación emergentes como puede ser la bioimpresión en 3D. Además, debido a la reversibilidad de estos nuevos materiales, es posible el desarrollo de otros como hidrogeles, aerogeles o xerogeles, cuya obtención marcaría nuevos retos en la llamada Química Verde.



Capítulo 2
Materiales tipo gel con líquidos iónicos y el
quitosano como refuerzo

2. Materiales tipo gel con líquidos iónicos y el quitosano como refuerzo

En este capítulo se introduce la definición de gel, así como sus posibles clasificaciones según diferentes criterios. Además, se profundiza en los conceptos de ionogel y bionogel celulósico para comprender los tipos de fases que lo integran y conocer el mecanismo de formación de los mismos y sus posibles aplicaciones. Asimismo, se realiza una breve descripción de la reología aplicada a geles. Por otra parte, se detalla tanto el concepto como la estructura química del quitosano, sus propiedades en función de sus parámetros fisicoquímicos y los posibles métodos de obtención a partir de quitina. Por último, se puntualizan las aplicaciones del quitosano y su uso como refuerzo de materiales.

2.1. Definición y clasificación de geles

De acuerdo con la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) un gel se define como “un material formado por una red coloidal no fluida o una red de polímeros que se expande a través de todo su volumen por un fluido” (IUPAC, 2007). Así pues, un gel es un material compuesto por dos o más fases heterogéneas: una fase líquida dispersa en gran cantidad y una o varias fases continuas sólidas (Osada y Khokhlov, 2001). Los requisitos básicos que debe cumplir un material para denominarlo gel son los siguientes (Marr y Marr, 2016):

- El material debe ser heterogéneo y la fase sólida no tiene que ser apreciable por el ojo humano.
- Las propiedades que presenta ante esfuerzos cortantes deben ser similares a las que muestra un material sólido.
- El material tiene que estar formado por una red tridimensional.

Los geles pueden ser clasificados en base a diferentes criterios: en función de la fase líquida, de la naturaleza de la fase sólida o de las interacciones entre dichas fases, según se muestra en la Figura 2.1.

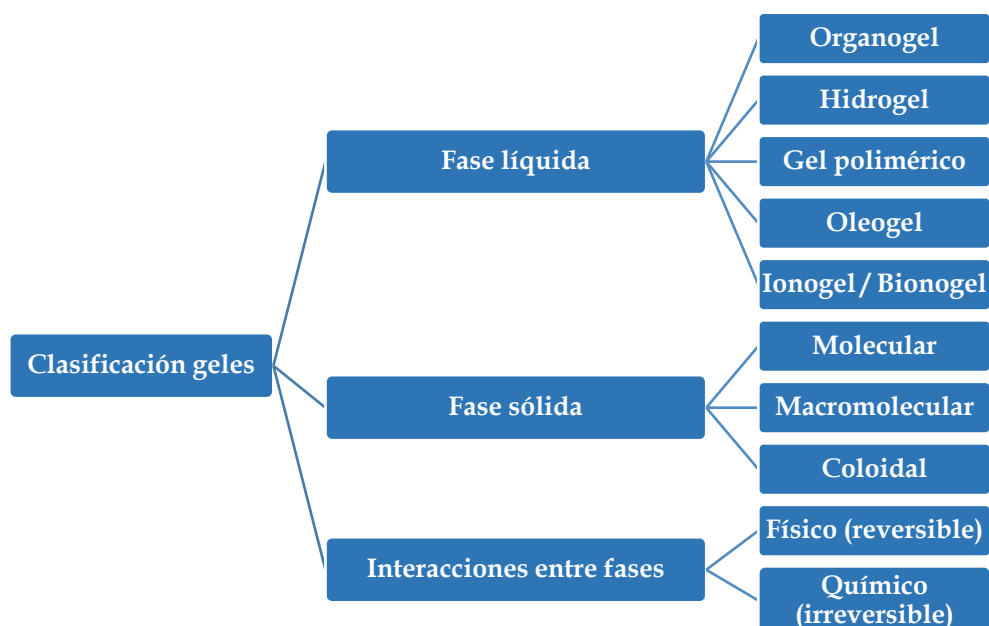


Figura 2.1. Clasificación de los geles en función de las fases y las interacciones entre ellas (Marr y Marr, 2016)

- En función de la fase líquida. En esta clasificación se distinguen cinco tipos de geles. Los organogeles son aquellos cuya fase líquida es un compuesto orgánico, mientras que en los oleogeles dicha fase es un aceite. Por otra parte, la fase líquida de los hidrogeles es acuosa y la de los geles poliméricos es un polímero. Finalmente, los ionogeles tienen un líquido iónico como fase líquida.
- En función de la fase sólida. La fase sólida puede ser molecular (supramolecular), macromolecular (polimérica) o coloidal.
- En función de las interacciones de las fases. Esta clasificación se divide en dos grupos. Los geles físicos o reversibles son aquellos en los cuales las fases que lo conforman se encuentran unidas mediante interacciones físicas (puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones π - π , etc.). Al contrario, los geles químicos o irreversibles presentan interacciones químicas, por ello, su red tridimensional es permanente (Tomasini y Castellucci, 2013; Marr y Marr, 2016).

En la presente tesis doctoral se ha formulado un nuevo tipo de ionogel al cual se le ha denominado bionogel. Este material se compone de un líquido iónico y una fase sólida, cuyas fuentes de obtención son completamente biológicas.

2.2. Ionogel y bionogel celulósicos

Un ionogel celulósico es un material de tipo gel formado por un líquido iónico como fase líquida y celulosa como fase sólida macromolecular. En el caso en el que el líquido iónico utilizado para formular el ionogel provenga de una base biológica, al material se le denomina bionogel. En este apartado se abordará la descripción de los componentes del ionogel o bionogel celulósico, así como las aplicaciones más relevantes de éstos.

2.2.1. La celulosa como fase dispersa

La celulosa es el polímero más abundante de la biosfera y se considera una fuente inagotable de materia prima para la creciente demanda de productos biodegradables y biocompatibles, ya que se regenera regularmente en la naturaleza en periodos de tiempo relativamente cortos, donde se estima que la producción es superior a $1,5 \cdot 10^{12}$ t/año (Zhang *et al.*, 2017). Este biopolímero se encuentra distribuido en plantas, animales, algas, hongos y minerales. De todas las fuentes de obtención, la que mayor cantidad de celulosa ofrece es la fibra vegetal, ya que ésta contribuye, aproximadamente, en un 40 % a la fracción carbonosa de las plantas, actuando como elemento estructural de las paredes celulares (Ummartyotin y Manuspiya, 2015; Rojas, 2016). Por este motivo, la extracción de celulosa se realiza, principalmente, a partir de madera, algodón y residuos provenientes de la actividad agrícola (Klemm *et al.*, 2005; Rojas, 2016). La estructura química de la celulosa consta de monómeros de anillos de D-glucopiranosos unidos por enlaces β -(1,4)-glucosídicos en el carbono 4, como se muestra en la Figura 2.2.

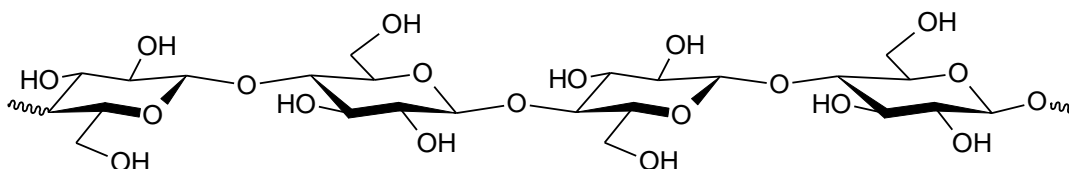


Figura 2.2. Estructura química de la celulosa

En los últimos años, la celulosa microcristalina (MCC) está emergiendo como una alternativa factible para la formulación de nuevos materiales. La MCC se obtiene a partir de la purificación y despolimerización parcial de la celulosa natural, y se caracteriza por poseer un alto grado de cristalinidad (normalmente entre un 55-80 %, dependiendo de la fuente de obtención). Las cadenas de celulosa se encuentran unidas linealmente mediante fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno. Los materiales compuestos que integran la MCC se están desarrollando para satisfacer diversas necesidades de productos ecológicos y económicos con alto rendimiento, durabilidad y tecnología sostenible. Este hecho se debe a las propiedades que ofrece la celulosa microcristalina, ya que es inocua, es biodegradable, tiene elevadas propiedades mecánicas, gran área superficial, biocompatibilidad y baja densidad, entre otras características (Trache *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018).

2.2.2. El líquido iónico como fase líquida

Los líquidos iónicos son sales orgánicas formadas por un anión y un catión, cuya temperatura de fusión es menor a 100 °C (Le Bideau *et al.*, 2011). Debido a la posibilidad de elección de la combinación anión-catión, estas sales han adquirido en los últimos años una gran atención (Kar *et al.*, 2019). Por tanto, debido a este abanico de posibilidades, los líquidos iónicos han ido evolucionando según los criterios fisicoquímicos y ecológicos que han ido surgiendo a lo largo de los años. Así, dependiendo de su estructura química y sus propiedades se pueden diferenciar tres generaciones de líquidos iónicos, como se muestra en la Figura 2.3.

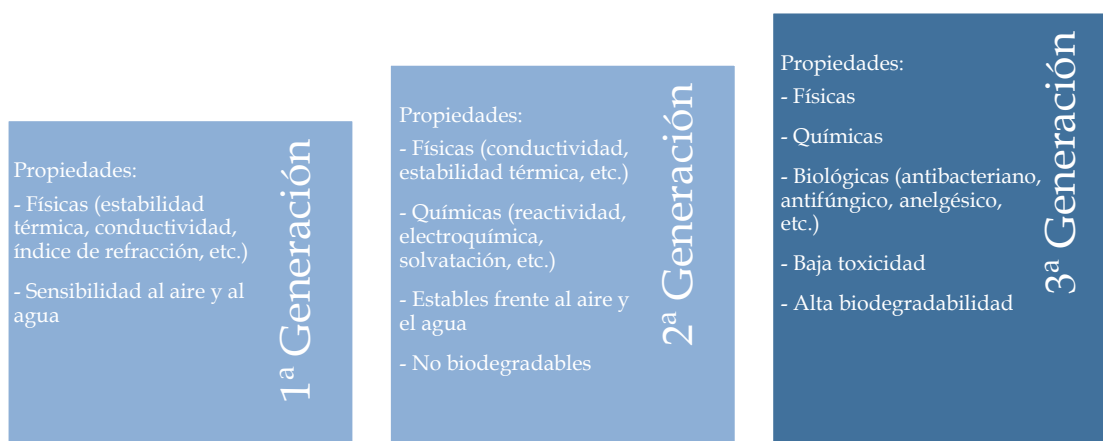


Figura 2.3. Propiedades de los líquidos iónicos según su generación (Hough *et al.*, 2007; de María, 2012; Egorova *et al.*, 2017)

La primera generación (1960-1990) está compuesta por líquidos iónicos cuyos cationes típicos eran dialquilimidazolio y alquilpiridinio, y los aniones eran cloroaluminato y halogenuros metálicos. Esta generación atrajo mucha atención debido a las propiedades físicas que presentaban los líquidos iónicos (Figura 2.3). Un inconveniente importante de esta generación fue la inestabilidad frente al aire y al agua de estas sales, lo que dificultó nuevas aplicaciones en diferentes campos de la química. La segunda generación de líquidos iónicos, o líquidos iónicos convencionales, son estables al aire y al agua y, por este motivo, han sido ampliamente investigados con el objetivo de utilizarlos en diferentes sectores tanto químicos como físicos desde 1990 hasta la actualidad. Entre los cationes más comunes de esta generación destacan los basados en imidazolio, y los aniones BF_4^- , PF_6^- y haluros (de María, 2012). Por último, la tercera generación (2000-actualidad) está formada por iones naturales, biodegradables, de fácil disponibilidad y baratos. Estos líquidos iónicos han surgido debido a la sensibilidad medioambiental de las dos últimas décadas. En este sentido, los líquidos iónicos de tercera generación no sólo tienen interés para procesos físicos o químicos, sino que también han adquirido un papel importante para estudios biológicos y ecológicos. Los iones más comunes en esta generación son la colina, los aminoácidos y los ácidos carboxílicos (Hough *et al.*, 2007; de María, 2012; Egorova *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Brunner *et al.*, 2019).

Las propiedades que presentan los líquidos iónicos son diversas en función de la selección de la combinación anión-catión. Esto, a su vez, hace que presenten un enorme potencial científico de cara a poder formular sustancias con las propiedades deseadas para cada aplicación (Wang *et al.*, 2017a). De forma general, los líquidos iónicos presentan baja volatilidad e inflamabilidad y alta estabilidad térmica en comparación con otros compuestos orgánicos (Le Bideau *et al.*, 2011; Voroshylova *et al.*, 2018). Cabe destacar la buena miscibilidad con gran multitud de sustancias, en particular con polímeros naturales difíciles de disolver con disolventes orgánicos convencionales (Swatloski *et al.*, 2002; Hanabusa *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018b). Debido a la gran versatilidad de propiedades en función del líquido iónico seleccionado, las aplicaciones de éstos abarcan una multitud de sectores, como, por ejemplo, ingeniería, electroquímica, biotecnología, catálisis, química y en el sector farmacéutico o energético (de María, 2012; Vekariya, 2017; Welton, 2018). En la Figura 2.4 se resumen algunas de sus aplicaciones en estos sectores. En particular, la formación de materiales con líquidos iónicos está adquiriendo cada vez más importancia. De hecho, tanto es así, que los líquidos iónicos se describen como “la base de una revolución en la ciencia de los materiales” (Egorova *et al.*, 2017).

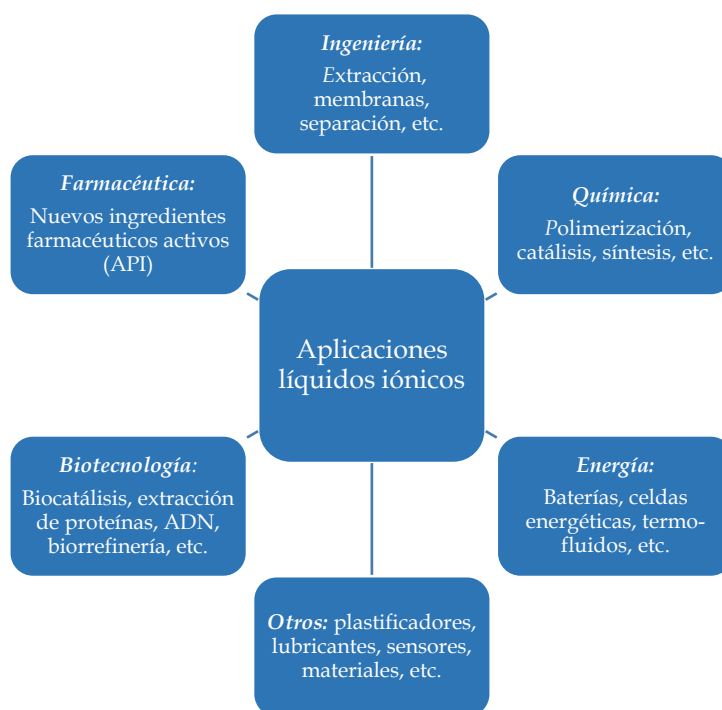


Figura 2.4. Ejemplos de aplicaciones en diferentes sectores de los líquidos iónicos

Los líquidos iónicos utilizados en la presente tesis doctoral para la formulación de los ionogel y bionogel son el cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio y los líquidos iónicos basados en un aminoácido y colina. A continuación, se describen brevemente las características de estos líquidos iónicos para su uso en la formulación de dichos materiales.

2.2.2.1. Líquido iónico cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio

El líquido iónico cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio, en adelante BmimCl, es un líquido iónico perteneciente a la segunda generación de líquidos iónicos. En la Figura 2.5 se muestra la estructura química de esta sal.

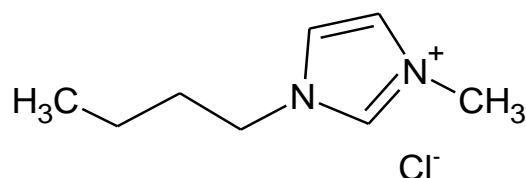


Figura 2.5. Estructura química del BmimCl

El BmimCl es uno de los líquidos iónicos más utilizados para la disolución de biopolímeros como la celulosa (Swatloski *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2006; Isik *et al.*, 2014; Kotov *et al.*, 2019). El hecho de poder disolver celulosa con facilidad ha sido de gran importancia en la última década para la formulación de nuevos materiales, ya que la disolución de este biopolímero con disolventes convencionales era un obstáculo en su procesamiento (Zhang *et al.*, 2017). En la Tabla 2.1 se recogen algunos ejemplos de los parámetros estudiados en la disolución de celulosa en BmimCl como son: el tipo de celulosa o el grado de polimerización (DP), la solubilidad de la misma en el líquido iónico en porcentaje en peso, la temperatura y el tiempo de disolución.

Tabla 2.1. Parámetros estudiados en la disolución de celulosa en el cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio (Pinkert *et al.*, 2009; Isik *et al.*, 2014)

Tipo de celulosa o grado de polimerización (DP)	Solubilidad (%)	Temperatura (°C)	Tiempo de disolución (h)
MCC Avicel®	5 - 20	83 - 110	2 - 12
DP 1000	3 - 10	70 - 100	-
DP 1000	25	Microondas	-
DP 593	13	83	12
DP 1198	10	83	12
DP 569	13,6	85	-

A partir de las disoluciones de BmimCl con la celulosa se han podido desarrollar diferentes materiales como películas, hidrogeles, aerogeles, ionogeles, esponjas y materiales compuestos (Zhang *et al.*, 2017; Peng *et al.*, 2018b; Fan *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2019).

2.2.2.2. Líquidos iónicos basados en aminoácido y colina

Los líquidos iónicos basados en un aminoácido y colina (ChAAIL), o líquidos biónicos, son sales pertenecientes a la tercera generación de líquidos iónicos. Están formados por el catión colina

(N, N, N-trimetiletanolamonio) y por un anión derivado de un aminoácido. La colina es un nutriente esencial que participa en multitud de diferentes biológicas de los seres humanos. Entre otras, la colina es precursora de la molécula acetilcolina, un neurotransmisor. Por tanto, este biocompuesto es biocompatible e inocuo (Isik *et al.*, 2013). Por otra parte, los aminoácidos son compuestos orgánicos muy abundantes en la naturaleza. Estos compuestos incluyen en su estructura química un grupo amino y un grupo carboxilo. Además del importante papel que tienen en la formación de proteínas, los aminoácidos están involucrados en procesos metabólicos clave que son cruciales para el crecimiento y el mantenimiento de los organismos (D'Este *et al.*, 2018). Por tanto, los ChAAIL son considerados líquidos iónicos de bajo coste (en comparación con los líquidos iónicos convencionales de segunda generación), biocompatibles, biodegradables y no tóxicos (Tao *et al.*, 2013). Todos estos motivos hacen que los ChAAIL sean buenos candidatos para la obtención de nuevos líquidos iónicos respetuosos con el medioambiente (Tarannum *et al.*, 2018). Las aplicaciones de los ChAAIL se centran en el sector industrial (por ejemplo, en biocatálisis o captura de CO₂), en el procesado de biomasa (para pretratamientos de la misma) y en el sector médico/farmacológico (por ejemplo, biosensores o liberación de fármacos). En este último sector, cabe destacar que el estudio y desarrollo de nuevos materiales con ChAAIL está adquiriendo mucha relevancia en estos últimos años (Egorova *et al.*, 2017; Gontrani, 2018).

La sal lisinato de colina, en adelante ChLys (Figura 2.6), ha destacado por ser uno de los líquidos iónicos de tercera generación más utilizados en los procesos de tratamiento de materiales lignocelulósicos (Liu *et al.*, 2018; Baral *et al.*, 2019).

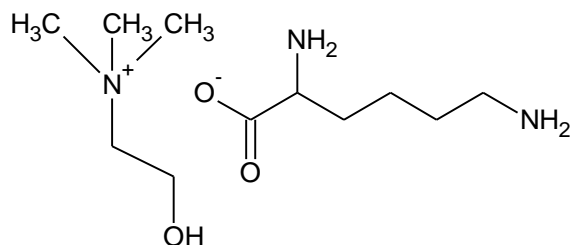


Figura 2.6. Estructura química del lisinato de colina (ChLys)

Aunque la celulosa posee solubilidades relativamente bajas en el ChLys, de, aproximadamente, un 0,5 % a temperaturas de 90-100 °C (Liu *et al.*, 2012; Kalinoski y Shi, 2019), todavía no se ha estudiado con detalle la interacción de este líquido iónico con la celulosa. Dicha interacción es prometedora para la posible formación de bionogeles, tema que se va a tratar en la presente tesis doctoral.

2.2.3. Formación del ionogel celulósico

Para la formación del ionogel celulósico se debe dar la disolución completa de la celulosa en el líquido iónico. Es bien conocido que para que se produzca tal disolución es necesaria la ruptura de los puentes de hidrógeno existentes entre las cadenas de celulosa. Por tanto, al romper dichos enlaces físicos, se deben formar nuevos puentes de hidrógeno fuertes con los grupos hidroxilos de la celulosa y el líquido iónico (Zhang *et al.*, 2017). El efecto sinérgico del catión y el anión del líquido iónico con la celulosa para formar los nuevos puentes de hidrógeno es la teoría con mayor peso en la actualidad (Mohd *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018b).

El profesor Kadokawa y sus colaboradores fueron de los primeros investigadores en proponer un mecanismo de formación del ionogel celulósico formulado con el líquido iónico BmimCl (Kadokawa *et al.*, 2008; Takada y Kadokawa, 2015), cuyo esquema, adaptado con la disolución de la celulosa, se muestra en la Figura 2.7.

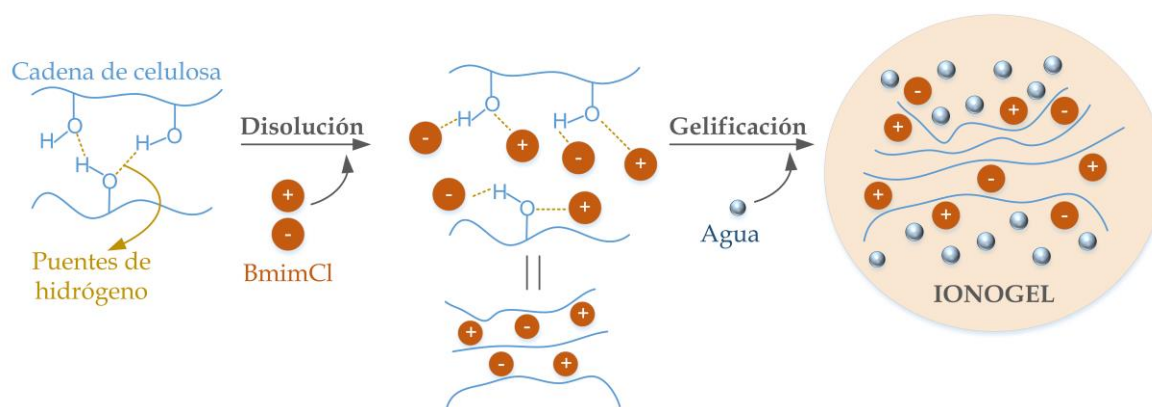


Figura 2.7. Disolución y mecanismo de formación del ionogel celulósico con BmimCl

Estos investigadores advirtieron de que en el BmimCl no disuelve completamente la celulosa desde un punto de vista molecular, lo que propicia la formación de agregados de partes cristalinas en la celulosa. También, observaron que la gelificación tenía lugar debido a las moléculas de agua presentes en la disolución, ya que el BmimCl tiene una elevada naturaleza higroscópica. Por tanto, los agregados de partes cristalinas de la celulosa, junto con las moléculas de agua, forman agregados físicos que actúan como puntos de entrecruzamiento para el proceso de gelificación.

2.2.4. Aplicaciones del ionogel celulósico

Los ionogel ofrecen un amplio abanico de aplicaciones en distintos sectores en función de los líquidos iónicos seleccionados (Figura 2.8). A continuación, se describen brevemente las aplicaciones más relevantes.

- Catalizadores y biocatalizadores. Los catalizadores que contienen inmovilizado un líquido iónico presentan dificultades difusionales entre reactivos y productos. Para paliar este problema se utilizan diferentes ionogeles en cuyos poros se lleva a cabo la reacción (Le Bideau *et al.*, 2011; Marr y Marr, 2016; Bothwell *et al.*, 2018; Rizzo *et al.*, 2019b). En cuanto a los biocatalizadores de ionogel, éstos presentan un medio de reacción atractivo debido a que se ha encontrado que la actividad de las biomoléculas en el ionogel pueden ser igual o incluso mayor que en disolventes convencionales, a la par que mejora la estabilidad de la enzima (Vioux *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2017).

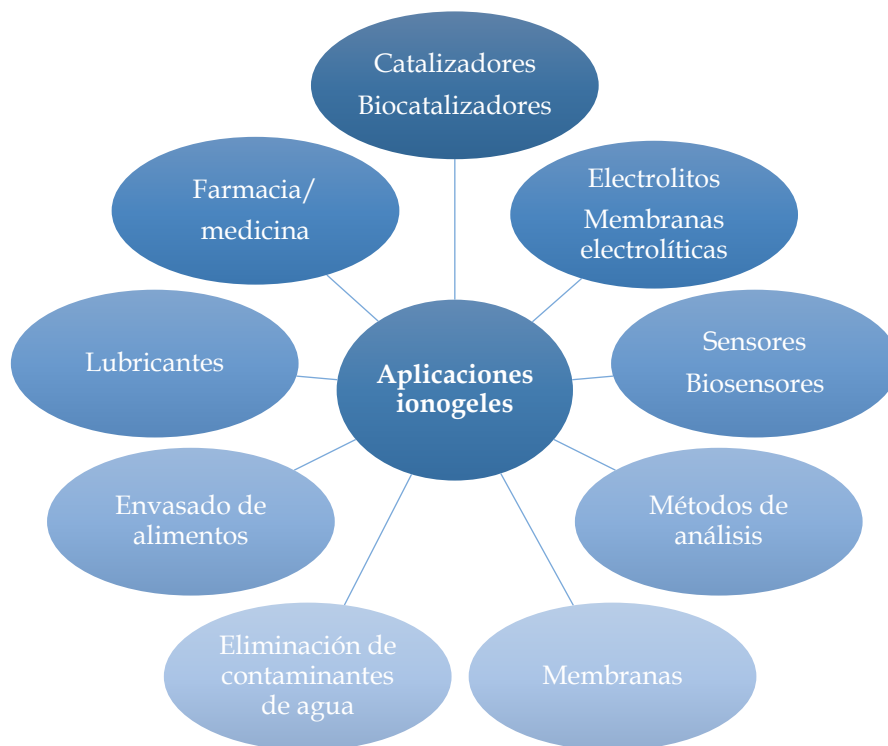


Figura 2.8. Aplicaciones de los ionogeles

- Electrolitos y membranas electrolíticas. Los ionogeles se presentan como una oportunidad para el sector energético, ya que pueden aumentar o disminuir su conductividad en función del líquido iónico empleado. Dentro de las aplicaciones en este sector destaca el desarrollo de electrolitos y membranas electrolíticas para el almacenamiento de energía (Marr y Marr, 2016; Liu y Yu, 2018; Zhu *et al.*, 2018; Adusei *et al.*, 2020).
- Sensores y biosensores. Los ionogeles también son utilizados como sensores para detectar la humedad de la respiración, para detectar enfermedades o para corroborar el buen funcionamiento de la salud humana, entre otros usos (Li *et al.*, 2019b; Ray *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). También han sido utilizados como biosensores para detectar glucosa o acetilcolinesterasa (Le Bideau *et al.*, 2011; Zamfir *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2015a; Tang *et al.*, 2019).

- Métodos de análisis. Los ionogel presentan una buena plataforma sólida para aplicaciones analíticas como la adsorción y la extracción en diferentes técnicas. Sin embargo, se considera que es un área aún inexplorada (Yavir *et al.*, 2018).
- Membranas. En los últimos años, se han desarrollado membranas de ionogel para su uso en la separación de CO₂, filtración de la luz ultravioleta o para desalinización (Chae *et al.*, 2018; Iqbal *et al.*, 2019; Mehta y Kumar, 2019b).
- Entre otras aplicaciones emergentes, caben destacar el envasado de alimentos, la eliminación de contaminantes de aguas residuales y su utilización como lubricantes (Yu *et al.*, 2017; Mehta y Kumar, 2019a; Rizzo *et al.*, 2019a).
- Farmacia/medicina. La aplicación de los ionogel en esta área tiene un gran futuro. El objetivo que se plantea es utilizar líquidos iónicos formulados a partir de un medicamento como, por ejemplo, el ibuprofeno (Viau *et al.*, 2010). Sin embargo, la falta de estudios toxicológicos hace que este campo todavía siga en desarrollo y se estén creando nuevas líneas de investigación en torno al uso de ionogel biodegradables y no tóxicos. En este sentido, se ha encontrado que algunos iones de amonio presentan actividad biológica antibacteriana (Le Bideau *et al.*, 2011).

Las aplicaciones de los ionogel celulósicos se han centrado, principalmente, en su uso como dispositivos de almacenamiento de energía y dispositivos electroquímicos (Song *et al.*, 2013; Thiemann *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2018), como sensores/biosensores para biometría y como dispositivos para el suministro de medicamentos (Smith *et al.*, 2017a, 2017b; Nevstrueva *et al.*, 2018; Prasad *et al.*, 2018; Kimura *et al.*, 2019). Sin embargo, pese a presentar un gran potencial futuro, uno de los mayores problemas que muestran estos ionogel viene dado por su toxicidad, ya que la mayoría de los líquidos iónicos utilizados pertenecen a la segunda generación.

Otra de las aplicaciones de los ionogel celulósicos es la elaboración de biomateriales. En este caso, el ionogel no es el producto final, sino un medio para llegar al biomaterial, ya que la celulosa se regenera mediante la adición de un antidisolvente y, normalmente, el líquido iónico se recupera (Kadokawa *et al.*, 2015; Takada y Kadokawa, 2015; Peng *et al.*, 2018a; Jo *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2019).

Una aplicación emergente, con expectativas, es el desarrollo del ionogel para producir un biomaterial celulósico mediante impresión 3D, ya que se puede obtener una geometría sofisticada y el proceso requiere un bajo coste (Wang *et al.*, 2018). Sin embargo, en general, los problemas que ha presentado la formulación de los biocomposites a partir del ionogel son, por una parte, la eliminación completa del líquido iónico, ya que puede quedar en torno a un 20 % de éste en el material (Tran *et al.*, 2013) y, por otra parte, el número de ciclos máximos de reutilización a los que se puede someter al líquido iónico sin cambiar sus propiedades para volver a formular ionogel. Si queda retenido

líquido iónico en el biocomposite es posible que la toxicidad de éste aumente si no se utiliza un líquido iónico biocompatible; además, al eliminar el líquido iónico, el biocomposite pierde las propiedades que le aporta el propio líquido iónico. Por todo ello, en la presente tesis doctoral se propone la formulación de bionogelatos celulósicos, es decir, la síntesis de ionogelatos que integren un líquido iónico biocompatible, como el ChLys, con la idea de llegar a un material con un mayor valor añadido y de baja toxicidad.

2.3. Caracterización mecánica de geles

La reología es la ciencia cuyo objeto de estudio es la respuesta que presenta la materia bajo la acción de una fuerza aplicada; en otras palabras, es el estudio de la deformación o el movimiento de la materia causado por fuerzas de contacto (Barnes *et al.*, 1989; Mezger, 2006). En este sentido, la reología permite determinar las propiedades mecánicas de los geles, así como evaluar los mecanismos y los factores involucrados en la formación del gel, es decir, su estructura interna (Irani *et al.*, 2019). Además, en virtud de los resultados del estudio reológico se puede establecer otra clasificación del gel en función de sus propiedades reológicas, como se detallará en el apartado 2.3.2.

2.3.1. Conceptos básicos de reología de materiales viscoelásticos

El comportamiento reológico de un material se define en función de la respuesta que éste presenta ante una deformación aplicada sobre él. Por tanto, un material con un comportamiento elástico posee la capacidad de recuperar su forma original cuando cesa la fuerza causante de su deformación. Por el contrario, un material con un comportamiento viscoso, al ser deformado no recupera su forma original debido a la disipación de la energía de deformación en forma de calor. Sin embargo, estos comportamientos son ideales, siendo lo más habitual encontrar materiales que aúnen respuestas elásticas y viscosas a la vez (Kavanagh y Ross-Murphy, 1998; Mezger, 2006). A este tipo de materiales se les conoce con el nombre de materiales viscoelásticos (Figura 2.9) y, prácticamente, la mayoría de los materiales exhiben este comportamiento (Kavanagh y Ross-Murphy, 1998). Por ejemplo, la viscoelasticidad se presenta en los polímeros y biopolímeros (en estado sólido, gel, fundidos y sus dispersiones), productos de higiene personal como el champú, en alimentos como el helado o el queso, y en fluidos orgánicos como la saliva (Subramanian y Gunasekaran, 1997; Mezger, 2006; Fung, 2013).

En cuanto a las deformaciones simples a las que se puede someter la materia, éstas pueden ser de cizalla o longitudinal. En el primer tipo, la fuerza se aplica paralelamente al plano de la superficie del material, lo que produce que las diferentes capas de partículas paralelas que componen el mismo se deslicen unas sobre otras. Sin embargo, en la deformación longitudinal, la fuerza causante de la deformación es perpendicular al material, causando su compresión o expansión (Barnes, 2000). El grado de deformación de un material o, simplemente, deformación (γ), se evalúa

en términos relativos, normalmente, como la deformación originada respecto a las condiciones iniciales del mismo.

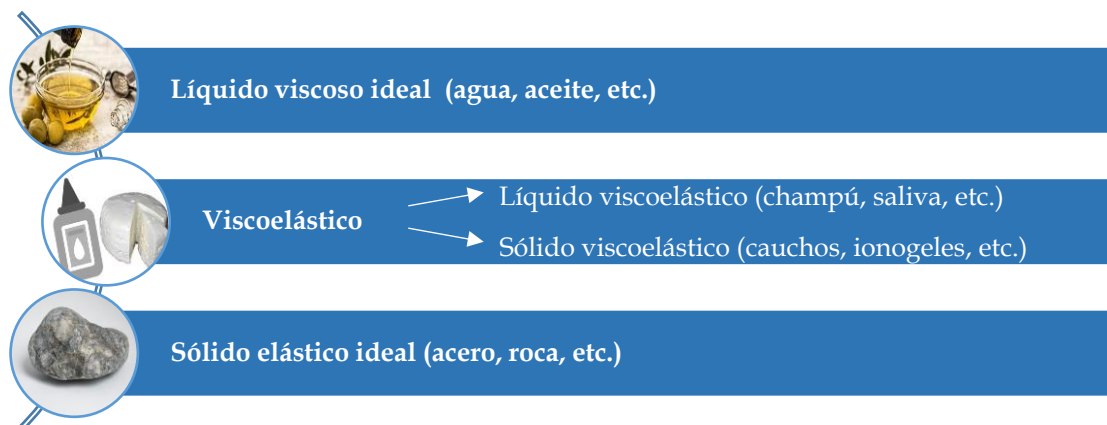


Figura 2.9. Clasificación de los materiales de acuerdo con su comportamiento reológico

Los materiales formulados en la presente tesis doctoral, los ionogeles y los bionogeles, presentan un comportamiento viscoelástico y, por ello, se caracterizarán de acuerdo a cómo se realiza mayoritariamente para los materiales tipo gel, es decir, mediante ensayos con deformación de cizalla oscilatorios (Kavanagh y Ross-Murphy, 1998). Este tipo de ensayos se realizan mediante la aplicación de un esfuerzo oscilante sobre una de las caras del material (Barnes, 2000; Sperling, 2005). La deformación causada, de tipo sinusoidal, se define mediante la Ecuación 2.1:

$$\gamma = \gamma_0 \text{sen}(\omega \cdot t) \quad [2.1]$$

donde γ_0 es la amplitud de la deformación y ω es la velocidad angular con la que se realiza tal deformación.

Como efecto de esta deformación se produce una tensión resultante sobre el material que, de la misma forma que la deformación, es de tipo sinusoidal. Para materiales viscoelásticos, a esta tensión se la denomina tensión compleja (τ^*), ya que es el resultado de la suma de la aportación de la tensión generada por el comportamiento elástico (τ') y por el comportamiento viscoso (τ'') del material. Estos parámetros reológicos responden a las siguientes ecuaciones:

$$\tau^* = \tau' + i \tau'' \quad [2.2]$$

$$\tau' = |\tau^*| \cos(\delta) \quad [2.3]$$

$$\tau'' = |\tau^*| \text{sen}(\delta) \quad [2.4]$$

donde δ es el ángulo de desfase con respecto a la deformación (0° para el comportamiento elástico puro y 90° para el comportamiento viscoso puro).

El reómetro es el equipo donde se realizan los ensayos oscilatorios. La diferencia de fase entre la deformación y la tensión resultante, con su correspondiente análisis matemático, permite la obtención del espectro reológico (Figura 2.10).

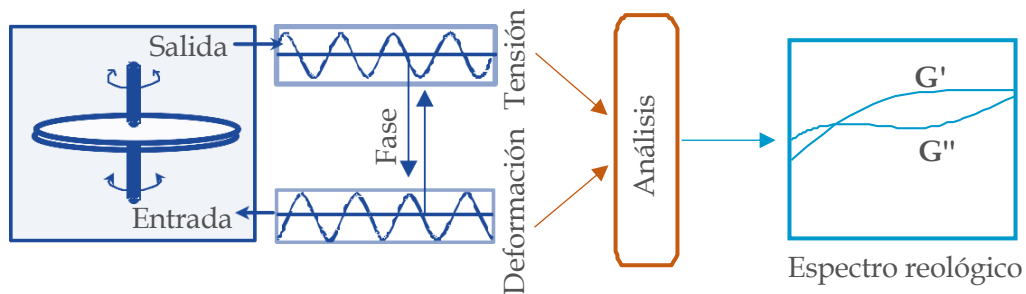


Figura 2.10. Esquema del funcionamiento de un reómetro en un ensayo oscilatorio (Barnes, 2000)

El espectro reológico de los materiales viscoelásticos se obtiene a partir de ensayos dinámicos de frecuencia a una determinada deformación. Estos espectros aportan información acerca del comportamiento del material a través del módulo complejo de cizalla (G^*). Este módulo se define como la relación entre la tensión compleja resultante y la deformación aplicada al material (Ecuación 2.5). A su vez, el módulo complejo está formado por el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G''), los cuales están relacionados con el comportamiento elástico y viscoso del material, respectivamente.

$$G^* = \tau^*/\gamma = G' + iG'' \quad [2.5]$$

El espectro reológico también permite evaluar la resistencia a la deformación del material mediante la viscosidad compleja (η^*), análogamente a la viscosidad dinámica. La viscosidad compleja es la combinación de una componente elástica (η') y una viscosa (η''), tal como se muestra en la Ecuación 2.6 (Barnes *et al.*, 1989; Barnes, 2000):

$$\eta^* = G^*/\omega = \eta' + i\eta'' \quad [2.6]$$

Para caracterizar el material sin modificar la estructura interna del mismo, la deformación aplicada debe encontrarse dentro de un intervalo conocido como la región lineal viscoelástica (RLV). En esta región el módulo complejo es independiente de la deformación aplicada al material, es decir, cuando se somete un material a una determinada deformación dentro de la RLV, éste intenta restablecer su estado de reposo (o de mínima energía) mediante fuerzas internas sin modificar su estructura (Barnes, 2000). Debido a que las deformaciones dentro de la RLV son muy pequeñas, la respuesta de los ensayos en las que se apliquen estas deformaciones estará fuertemente relacionada con la estructura interna del material; de esta forma, la reología nos permite comprender la estructura molecular interna de los materiales con un simple ensayo macromolecular (Botella, 2005). El límite de la RLV (γ_c) es aquel valor de deformación por encima del cual se modifica la estructura interna del material.

2.3.2. Espectro reológico de geles

El espectro reológico se obtiene mediante un ensayo dinámico de barrido de frecuencia a una deformación determinada, como se ha comentado en el apartado 2.3.1. El estudio de estos espectros es de gran importancia para los materiales de tipo gel debido a que proporciona información acerca del comportamiento dominante (elástico/viscoso), de las propiedades mecánicas e incluso de la estructura interna del material (Irani *et al.*, 2019). Con la información obtenida de la estructura interna es posible proponer el mecanismo de formación del gel.

La variación de los módulos en el espectro reológico da lugar a la identificación de diferentes regiones en función de cuál sea el comportamiento dominante del material. En este sentido, de forma genérica, es posible distinguir cuatro zonas características, como se muestra en la Figura 2.11.

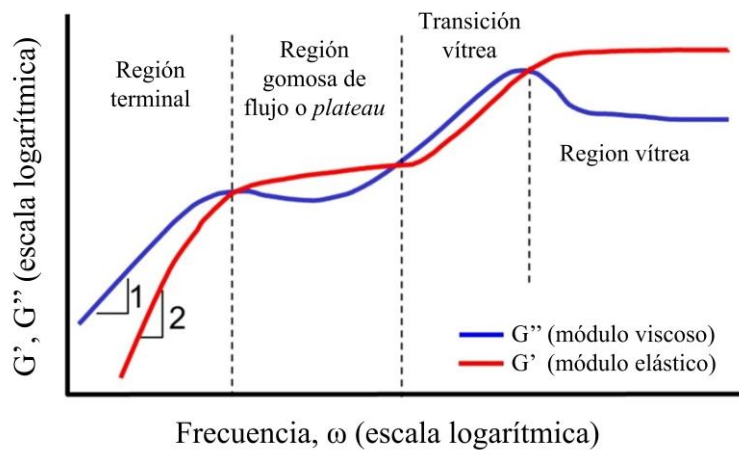


Figura 2.11. Espectro reológico genérico (Sperling, 2005)

La primera región se corresponde con la de flujo líquido o región terminal, donde el material presenta un elevado comportamiento viscoso ($G'' > G'$). Al aumentar la frecuencia tiene lugar la segunda región, denominada región gomosa de flujo o *plateau*. Al comienzo de esta región, el módulo elástico y el módulo viscoso se entrecruzan en el punto de gel (Sperling, 2005). Esta región se caracteriza por presentarse en un intervalo medio de frecuencia del espectro, donde el comportamiento predominante es el elástico ($G' > G''$). Al incrementar la frecuencia, el módulo viscoso comienza a aumentar y la estructura del material empieza a ordenarse dando lugar a una transición denominada transición vítrea (cuarta región). La temperatura a la cual se cruzan los módulos G' y G'' en esta región, se conoce como la temperatura de transición vítrea, T_g (Barnes *et al.*, 1989). La T_g es importante para la caracterización de materiales, ya que las propiedades mecánicas de éstos se ven modificadas en esta transición, es decir, hay un cambio brusco en el comportamiento del material de elástico a viscoso. Por ello, esta transición permite determinar las condiciones óptimas donde el uso del material es adecuado. Por último, la quinta región del espectro es la región

vítrea. En esta región el comportamiento elástico sobresale frente al viscoso ($G' > G''$) y la estructura del material se encuentra ordenada (Sperling, 2005).

En el caso de los geles químicos (geles unidos por fuerzas covalentes), la zona del espectro representativa de los mismos es la de *plateau*, es decir, la región intermedia donde el módulo elástico es mayor que el módulo viscoso (Ross-Murphy, 1995; Kavanagh y Ross-Murphy, 1998; Ross-Murphy, 1998). Sin embargo, para el caso de los geles físicos es posible distinguir dos tipos de geles, débiles y fuertes, en función de la forma que muestren en esta región (Ross - Murphy, 1998). En la Figura 2.12 se muestran ejemplos de espectros de estos tipos de geles (Ross - Murphy, 1995).

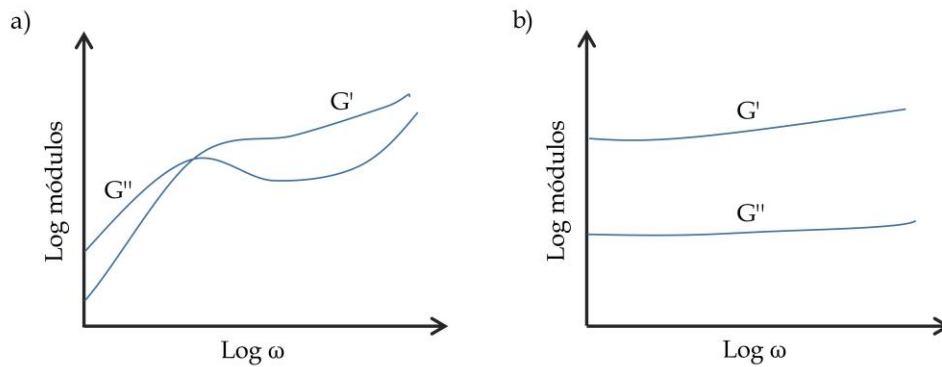


Figura 2.12. Espectro reológico de (a) un gel físico débil, y (b) de un gel físico fuerte

Tanto los geles físicos fuertes como los débiles presentan un comportamiento elástico dominante a pequeñas deformaciones, es decir, el mismo espectro reológico ($G' > G''$). No obstante, los módulos de los geles físicos fuertes son prácticamente constantes en el espectro en un amplio intervalo de frecuencias. Además, al aplicar una deformación elevada, estos geles tienden a romperse y no pueden volver a formarse a no ser que se les aplique cierta energía para crear de nuevo la red tridimensional. Al contrario, los geles físicos débiles presentan una dependencia clara con la frecuencia en su espectro, y fluyen ante una elevada deformación en lugar de escindirse (Picout y Ross-Murphy, 2003; Ferenc Horkay, 2018).

Otro criterio utilizado para discernir entre geles físicos débiles y fuertes es la relación entre los módulos (G'/G''). Si la relación G'/G'' para un amplio intervalo de frecuencias del espectro es mayor de 10, se dice que los geles son fuertes, y si es menor son geles débiles (Prasad *et al.*, 2009).

2.4. El quitosano

El quitosano se ha utilizado como refuerzo en la formulación de los ionogeles y bionogeles celulósicos. Así pues, en este apartado se describirán los aspectos más relevantes de este polímero como es su estructura, sus propiedades, los métodos de obtención existentes, así como las técnicas para su caracterización y sus aplicaciones.

2.4.1. Estructura química y propiedades

El quitosano es un polisacárido lineal semicristalino, cuya estructura química es muy similar a la de la celulosa (Figura 2.13). Este polisacárido es un copolímero compuesto de unidades monoméricas D-glucosamina (Glc) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) unidas por enlaces β -1,4 glucosídicos (Peniche *et al.*, 2008).

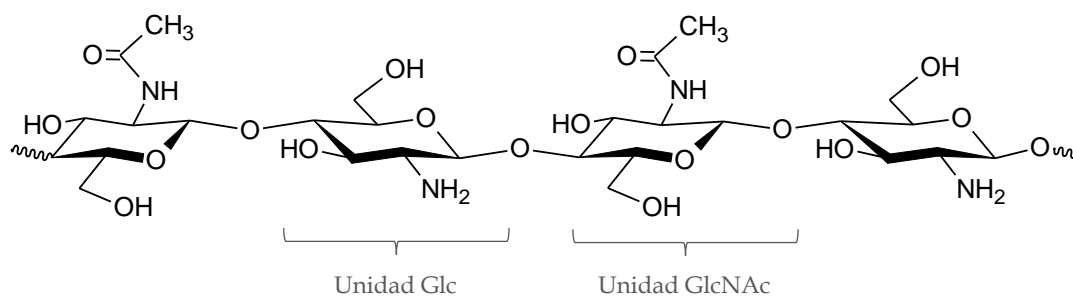


Figura 2.13. Estructura química del quitosano

El quitosano se obtiene a partir del proceso de desacetilación de la quitina. Esta última es un biopolímero, compuesto mayoritariamente de unidades GlcNAc, que se encuentra distribuido en la naturaleza en forma de microfibras cristalinas ordenadas, formando componentes estructurales del exoesqueleto de artrópodos o de las paredes celulares de hongos y levaduras, como elemento de refuerzo (Rinaudo, 2006). Los exoesqueletos de animales de mar (cangrejos, langostas, gambas, camarones, anélidos, etc.) y de insectos (escorpiones, cucarachas, escarabajos, hormigas, etc.), así como las paredes celulares de algunos tipos de algas y levadura de tipo β o blastocladiales son fuentes de quitina (Nagahama *et al.*, 2008).

Los parámetros más importantes para establecer la identidad fisicoquímica del quitosano son el grado de desacetilación (DD) y el peso molecular promedio (M_w) (Rinaudo, 2006; Aranaz *et al.*, 2009; Dash *et al.*, 2011). El DD es la fracción molar de unidades Glc presentes en la cadena polimérica (Figura 2.14). De esta forma, cuando el DD es mayor del 50 %, al polímero se le llama quitosano, y cuando este valor se encuentra por debajo del 50 %, el polímero es conocido como quitina (Roberts, 1992). Otro criterio para discernir entre estos polímeros es intentar disolverlos en un medio ácido, pues la quitina no se disuelve en dicho medio y el quitosano sí, parcialmente para bajos DD y completamente para altos DD (Ottey *et al.*, 1996).

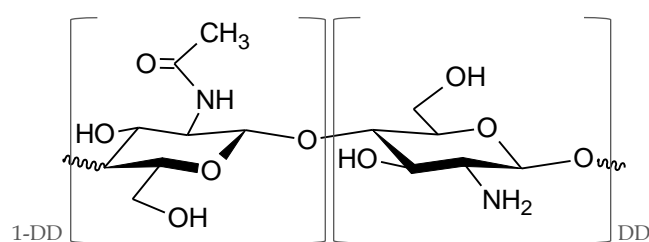


Figura 2.14. Estructura química de la quitina/quitosano en función del DD

Las propiedades que presenta el quitosano resultan de gran interés en la sociedad debido a que tienen un impacto positivo para la salud. Por ejemplo, presentan capacidad anticoagulante de la sangre, actividad antitumoral y antiulceral. También, se ha comprobado que es analgésico, mucoadhesivo, hemostático, antimicrobiano y antioxidante (Dash *et al.*, 2011; Baranwal *et al.*, 2018). Además de este carácter biológico, este biopolímero exhibe afinidad por metales como cobre, cadmio, magnesio o hierro, útiles en la producción de medicamentos y apósitos médicos (Muxika *et al.*, 2017). Cabe destacar que las propiedades del quitosano se encuentran íntimamente relacionadas con su DD y su M_w . En este sentido, al variar dichos parámetros éstas varían como se muestra en la Figura 2.15 (Dash *et al.*, 2011).

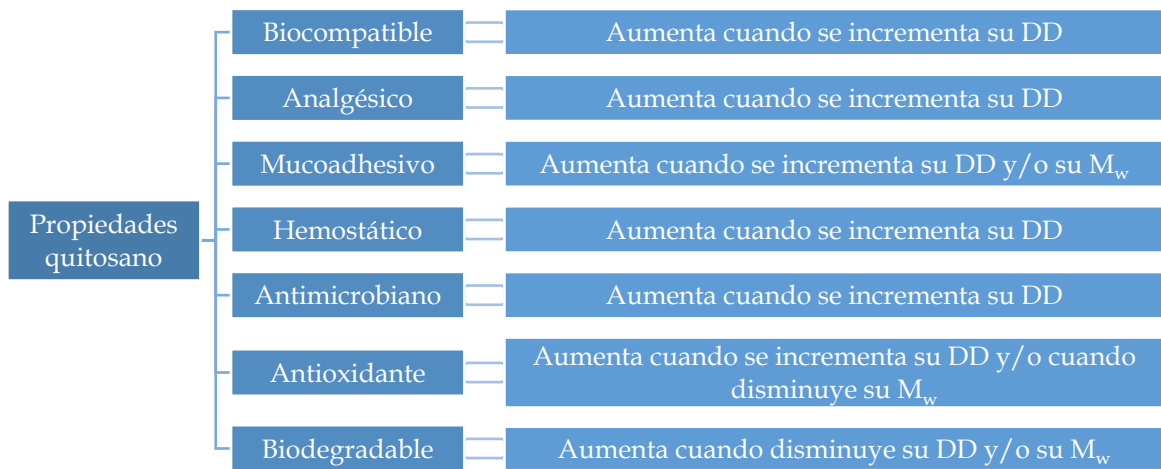


Figura 2.15. Propiedades del quitosano y su relación con el DD y M_w

Por otra parte, la cristalinidad del quitosano también varía con el DD, ya que, al aumentar el DD, la cristalinidad del polímero es menor debido a que es mayor la cantidad de unidades Glc presentes en la cadena de quitosano (Dash *et al.*, 2011).

2.4.2. Métodos de obtención del quitosano y caracterización

El quitosano se obtiene a partir de la desacetilación de la quitina empleando un método químico o enzimático (Figura 2.16). Para el método químico, la desacetilación de la quitina se realiza mediante la hidrólisis de los grupos N-acetilo en condiciones heterogéneas u homogéneas en presencia de un medio alcalino.

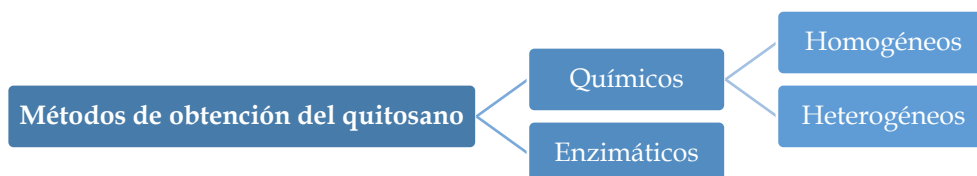


Figura 2.16. Métodos de obtención del quitosano

En el proceso heterogéneo, la quitina se pone en contacto con una disolución de NaOH o KOH (medios fuertemente alcalinos) con una concentración de un 40-50 % (Kurita, 2001). Las temperaturas de reacción utilizadas se encuentran entre los 90 °C y los 160 °C, y los tiempos de reacción de unas pocas horas a varios días (Chang *et al.*, 1997; Methacanon *et al.*, 2003). De forma general, las condiciones de reacción citadas (temperatura, concentración de la disolución alcalina y tiempo de reacción) dependen de la procedencia de la quitina y del DD deseado del quitosano (Methacanon *et al.*, 2003; Younes *et al.*, 2014). En el caso del proceso homogéneo, la quitina se dispersa en una solución concentrada de NaOH a 25 °C durante 3 h. Después, la quitina alcalina se suspende en hielo a 0 °C, para obtener de esta forma un quitosano parcialmente soluble con un DD entre un 45 y 52 % (Yadav *et al.*, 2019). Este proceso se utiliza menos debido a que el DD del quitosano alcanzado es mucho menor que en el caso de los procesos heterogéneos con sosa, en los que se consiguen más de un 90 % de DD (Methacanon *et al.*, 2003).

Por otra parte, el método enzimático utiliza procesos biológicos con enzimas desacetilasas de diversos tipos de hongos (Aranaz *et al.*, 2009). Tanto este último método, como el método homogéneo, son menos utilizados debido a que la sencillez del método heterogéneo es mayor y, además, en el método enzimático existe el inconveniente de la actividad limitada de las enzimas (Aranaz *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2019).

Las fuentes de quitina principales para la obtención del quitosano proceden del exoesqueleto de diferentes especies de cangrejo, camarones y langostas (Kurita, 2001). Estos exoesqueletos conforman una fuente importante de residuos derivados de la industria pesquera y de la industria alimentaria (Al Sagheer *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2019). Por tanto, es importante generar fuentes de valorización de estos residuos, como es la producción de quitosano. Entre las especies de cangrejos más utilizados para la extracción de quitina, la especie *Chionoecetes opilio*, comúnmente conocida como cangrejo de las nieves, es la que mayor cantidad de quitina contiene en su estructura, cerca del 27 % (Muzzarelli y Peter, 1997; Hamed *et al.*, 2016), frente a la especie *Callinectes sapidus* (del 12 al 13 % de quitina) o a la especie *Portunus trituberculatus* (17,1 % de quitina). Por este motivo, en la presente tesis doctoral se ha elegido la especie *Chionoecetes opilio* como fuente de quitina para la elaboración de quitosano.

2.4.2.1. Determinación del grado de desacetilación

Las técnicas para la determinación del DD dependen, principalmente, del estado físico de la muestra. Así pues, se pueden agrupar en dos grandes grupos: análisis de muestras en disolución, es decir, con un acondicionamiento previo del polímero (disolución en un medio ácido) y análisis de muestras en estado sólido (preferiblemente con textura pulverizada). Los primeros son más adecuados para el análisis del quitosano y los segundos tanto para la quitina como el quitosano

independientemente de su solubilidad (Belgacem y Gandini, 2008). En la Tabla 2.2 se recogen las diferentes técnicas que se utilizan y una breve descripción de las mismas.

Tabla 2.2. Técnicas y procedimientos de caracterización del quitosano y la quitina para la determinación del DD (Belgacem y Gandini, 2008; Kasaai, 2009)

	Técnicas	Procedimientos	Observaciones
Muestras en disolución	Conductimetría	El quitosano se disuelve en exceso en HCl (Raymond <i>et al.</i> , 1993).	Valoración con NaOH necesaria para neutralizar los grupos amino libres en el quitosano.
	Espectroscopía ^1H RMN ^a	- El quitosano natural se disuelve en DCl al 2 % a 70 °C, cuya secuencia de pulsos es: $\tau = 40$ s, $\theta = 45^\circ$ (Hirai <i>et al.</i> , 1991). - El quitosano natural se disuelve en DCl al 2 % a 27 °C, cuya secuencia de pulsos es: $\tau = 13$ s, $\theta = 90^\circ$ (Fernandez-Megia <i>et al.</i> , 2005).	En todos los casos, DD se calcula mediante la división de las áreas de las resonancias de las señales referidas a los grupos no acetilados y los grupos acetilados.
	Espectroscopía UV/VIS ^b	El quitosano se disuelve en ácido acético 0,01 M. Previamente se realiza un calibrado con <i>N</i> -acetil glucosamina (Muzzarelli y Rocchetti, 1985; Tan <i>et al.</i> , 1998).	La primera derivada de la curva de absorbancia UV-Vis se registra en el punto de aporte nulo de ácido acético.
	Método enzimático	El quitosano se disuelve en una disolución de ácido acético al 0,2 % y se incuba con enzimas durante 12 h a 40 °C (Nanjo <i>et al.</i> , 1991).	Los grupos liberados de los monómeros que forman el quitosano son determinados por colorimetría específica o HPLC ^c .
	Potenciometría	El quitosano se disuelve en exceso en HCl (Broussignac, 1968).	La valoración con NaOH mide el consumo de HCl necesario para protonar los grupos amino.
Muestras sólidas	Análisis elemental	Se analiza en polvo directamente (Muzzarelli y Peter, 1997).	Cálculo de DD con la relación C/N.
	Análisis térmico	Se analiza en polvo directamente (Alonso <i>et al.</i> , 1983).	Basado en termogravimetría y en la entalpía de degradación de la muestra.
	Espectroscopía ^{13}C RMN ^d	No se necesita preparación de la muestra (Duarte <i>et al.</i> , 2001).	El retardo de relajación se debe optimizar. El DD se calcula a partir de las áreas relativas de las resonancias totales de CH_3 .
	Espectroscopía FTIR ^e	La muestra de quitosano se mezcla con KBr seco (~1:100) con el fin de realizar las pastillas necesarias para la medida (Baxter <i>et al.</i> , 1992; Brugnerotto <i>et al.</i> , 2001b; Duarte <i>et al.</i> , 2002).	La literatura describe diferentes conjuntos de bandas de referencias calibradas con el DD obtenido mediante RMN, espectroscopía UV-Vis o valoración.
	Espectroscopía ^{15}N RMN ^f	No se necesita preparación de la muestra (Heux <i>et al.</i> , 2000).	Se recomienda su uso para quitinas y complejos de quitosano asociados con otros polisacáridos.
	HPLC	Se hidroliza la muestra con H_2SO_4 2,4 M (Niola <i>et al.</i> , 1993).	Basado en la determinación de los grupos acetilo libres.

^a Resonancia magnética nuclear de protón. ^b Ultravioleta visible. ^c Cromatografía líquida de alta resolución.

^d Resonancia magnética nuclear de carbono. ^e Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier.

^f Resonancia magnética nuclear de nitrógeno.

Para los análisis que se llevan a cabo de forma habitual, el método de espectroscopía UV-Vis proporciona buenos resultados, pero es necesaria la disolución del quitosano. Por otro lado, la espectroscopía IR es la técnica más simple y fiable para las muestras tanto de quitina, como de quitosano en estado sólido (Belgacem y Gandini, 2008). Cabe destacar que la técnica de resonancia magnética nuclear se ha utilizado a lo largo del tiempo para estandarizar o calibrar otras técnicas (Kasaai, 2009).

El mayor problema para la determinación del DD, mediante las técnicas en las que la muestra se encuentra en disolución, está relacionado con la pobre solubilidad del quitosano. Además, otro aspecto a considerar en la elección de la técnica es la cantidad necesaria de muestra para el análisis. Generalmente, cuanto más avanzada y nueva es la técnica de determinación del DD, menores cantidades de muestra se precisan (Kasaai, 2009).

2.4.2.2. Determinación del peso molecular promedio

El peso molecular promedio, M_w , afecta a las propiedades fisicoquímicas y biológicas del quitosano. Tanto es así, que en función de éste se modifican las propiedades de los materiales obtenidos con este polisacárido, como es en el caso de las propiedades mecánicas de los materiales, del tamaño de poro de membranas o de la capacidad antibacteriana (Belgacem y Gandini, 2008; Kong *et al.*, 2010; Zargar *et al.*, 2015).

Los métodos utilizados para determinar el peso molecular promedio del quitosano son similares a los empleados para cualquier polímero: viscosimetría, dispersión de luz, cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), osmometría y equilibrio de sedimentación por ultracentrifugación (Belgacem y Gandini, 2008). A continuación, se van a describir brevemente las tres primeras, ya que son las técnicas más empleadas:

- Viscosimetría. Es el método más utilizado para determinar el peso molecular del quitosano debido a su simplicidad. Se basa en la correlación (Ecuación de Mark-Houwink) entre los valores de viscosidad intrínseca con los del M_w que, en este caso, por tratarse de esta metodología, se denomina peso molecular viscoso, M_v . Para ello, se disuelve el polímero en un medio ácido y se mide el tiempo que tarda en fluir entre dos marcas señaladas en el viscosímetro capilar (Zhang y Neau, 2001; Belgacem y Gandini, 2008).
- Dispersión de luz estática (SLS). Esta técnica proporciona la determinación directa del peso molecular promedio ponderado del polímero junto con el radio de giro medio z ($\langle S^2 \rangle^{1/2}$) y el segundo coeficiente viral (Γ_2), sin necesidad de la realización de un calibrado.

A pesar de ser un método absoluto que proporciona información muy importante sobre las propiedades del polímero, el uso de esta técnica es limitado, ya que requiere condiciones

experimentales estrictas, equipos costosos y polímeros completamente solubles y libres de sólidos. Conseguir esto es complejo, pues el quitosano se disuelve en medios ácidos y la quitina no, por lo que una muestra con un DD bajo no se podría medir correctamente (Belgacem y Gandini, 2008).

- Cromatografía por exclusión de tamaño (SEC). Este método permite obtener no sólo la determinación del peso molecular, sino también su distribución estadística. La separación de las especies del polímero tiene lugar según su tamaño molecular, o más estrictamente, según su volumen hidrodinámico.

Este método es rápido, reproducible y simple en comparación con la SLS o con la osmometría. El equipo ha de calibrarse con una fracción polimérica de M_w conocido. Sin embargo, no existen estándares de calibrado de quitosano, por lo que ha de realizarse una curva de calibrado universal con estándares de pululano (Belgacem y Gandini, 2008).

Los valores de peso molecular promedio del quitosano se sitúan, de acuerdo con la bibliografía, entre $1 \cdot 10^5$ y $1 \cdot 10^6$ g/mol (Huei y Hwa, 1996; Kumar, 2000; Brugnerotto *et al.*, 2001a; Zhang y Neau, 2001; Yen *et al.*, 2009; Zargar *et al.*, 2015). Dicho intervalo varía en función de la especie de la que provenga el quitosano: cangrejos, camarones, calamar, etc. (Kumar, 2000).

2.4.3. Aplicaciones del quitosano

Las aplicaciones del quitosano barren una amplia gama de sectores debido a las propiedades fisicoquímicas y biológicas que se han descrito en el apartado 2.4.1 y a que es una materia prima muy barata porque proviene de un residuo (Aranaz *et al.*, 2009). Las aplicaciones más importantes se pueden agrupar en los siguientes campos: biomedicina, farmacia, cosmética, industria del papel, tratamiento de aguas, agricultura, industria textil, industria alimentaria e inmovilización de biomoléculas (Aranaz *et al.*, 2009; Hamed *et al.*, 2016; Muxika *et al.*, 2017). En la Tabla 2.3 se recogen algunos ejemplos de las aplicaciones en estos campos.

El quitosano, por tanto, abre nuevos horizontes en cuanto a la emergente utilización de materiales respetuosos con el medioambiente, cuyo uso implica la valorización de una gran cantidad de residuo y su conversión en productos de alto valor añadido.

Tabla 2.3. Aplicaciones del quitosano (Aranaz *et al.*, 2009; Hamed *et al.*, 2016; Muxika *et al.*, 2017)

Sector	Ejemplos de aplicaciones
Biomédico y farmacéutico	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tratamiento de quemaduras de diferentes grados. ▪ Preparación de piel artificial. ▪ Apósitos para el tratamiento y cicatrización de heridas y úlceras. ▪ Lentes de contacto. ▪ Membranas de diálisis de sangre. ▪ Sistemas de distribución genética. ▪ Terapia dental. ▪ Sistemas de liberación de fármacos. ▪ Regeneración de tejidos y órganos mediante materiales 3D porosos (<i>scaffolds</i>). ▪ Nuevos materiales para el desarrollo de órganos. ▪ Encapsulación y protección de genes y constituyentes activos. ▪ Puntos de sutura quirúrgicos.
Cosmético y dermatológico	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Productos para el cuidado de la piel y el pelo. ▪ Encapsulación de ingredientes activos.
Papelerero	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aporte de fuerza al papel frente a la humedad. ▪ Coagulantes/floculantes. ▪ Ingrediente del papel para nuevos envases alimentarios.
Tratamiento de aguas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tratamiento de aguas residuales. ▪ Recuperación de iones metálicos y plaguicidas. ▪ Eliminación de fenol, proteínas, radioisótopos, colorantes, etc.
Agricultura	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recubrimiento de frutas y semillas como fertilizante y fungicida. ▪ Mejora la defensa de las plantas frente a microorganismos. ▪ Acelera la germinación de semillas.
Textil	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fibras antimicrobianas y antialérgicas.
Alimentación	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Prebióticos (fibras dietéticas). ▪ Envases para alimentos. ▪ Emulsionante alimentario. ▪ Clarificador y desacidificador de frutas y bebidas. ▪ Conservante, estabilizante y antioxidante de alimentos. ▪ Aditivo para piensos.
Inmovilización de biomoléculas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inmovilización de enzimas y células. ▪ Encapsulamiento de biocatalizadores. ▪ Biosensores.

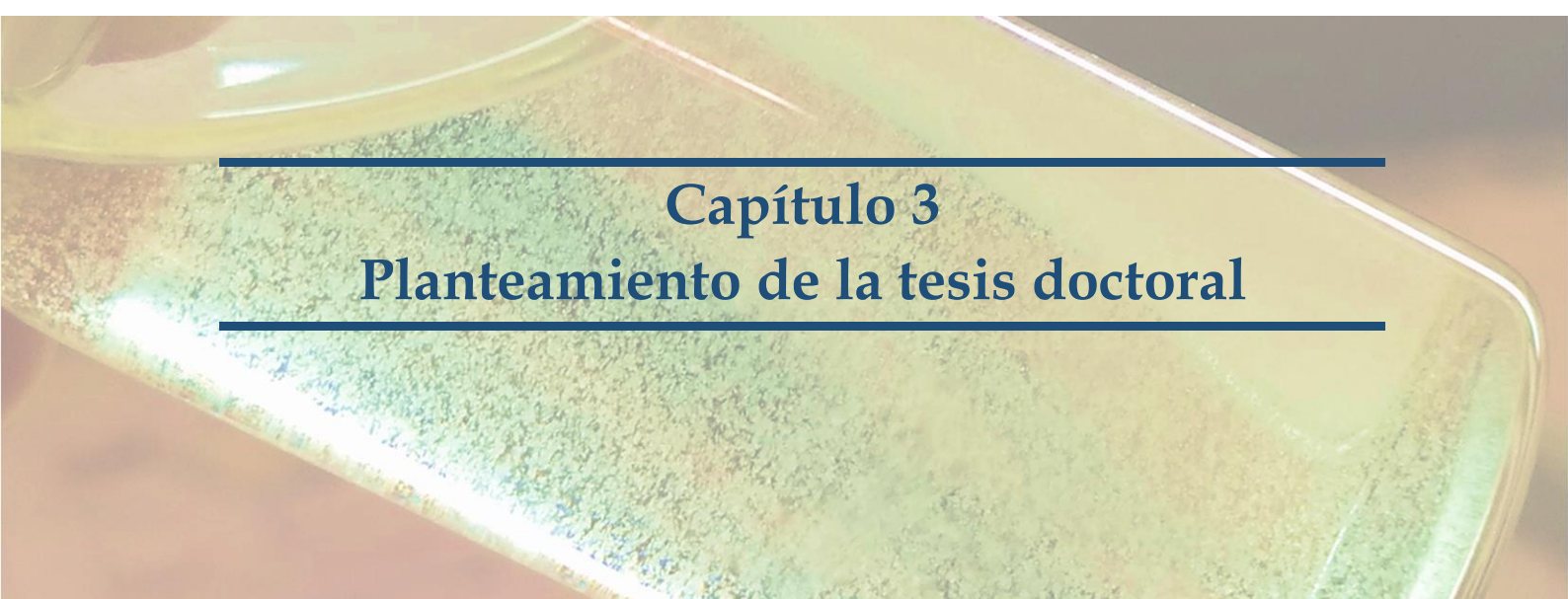
2.4.4. Refuerzo de materiales con quitosano

El quitosano ha sido ampliamente utilizado para el desarrollo de diversos materiales, destacando su uso como refuerzo debido a que aumenta las propiedades mecánicas y antibacterianas de los materiales. En la Tabla 2.4 se muestran ejemplos de materiales reforzados con quitosano, así como la mejora aportada y la aplicación de éstos.

Tabla 2.4. Ejemplos de materiales reforzados con quitosano

Material reforzado	Mejoras y aplicación	Referencia
Scaffolds de quitosano reforzados con fibras de quitosano	Mejora de la resistencia y de la rigidez del <i>scaffold</i> de quitosano. Aplicación: <i>scaffold</i> para válvulas cardíacas.	Albanna <i>et al.</i> (2012)
Films biodegradables de almidón reforzados con quitosano	Se mejora la resistencia a la tracción, el módulo de tracción y la estabilidad térmica. Además, se reduce la permeabilidad del vapor de agua y la ratio de transmisión de oxígeno. Aplicación: embalaje.	Akter <i>et al.</i> (2014)
Materiales de polibutilenosuccinato reforzados con nanofibras de quitosano	Mejoras de las propiedades mecánicas y de las cinéticas de biodegradación. Aplicación: nanocompuestos para biomedicina.	Pinho <i>et al.</i> (2014)
Resina de polietersulfona reforzada con nanofibras de quitosano	La adición de quitosano mejoró tanto la resistencia a la tracción, así como el módulo de Young y el coeficiente de expansión térmica. Aplicación: plástico transparente.	Chen <i>et al.</i> (2014)
Esponjas de celulosa reforzadas con micropartículas de quitosano	La resistencia a la rotura de las esponjas aumentó con la adición de quitosano. También, las esponjas mostraron una excelente actividad antibacteriana. Aplicación: apósito de heridas.	Fangbing <i>et al.</i> (2014)
Films de gelatina de pescado reforzados con nanopartículas de quitosano	La adición de quitosano mejora la resistencia a la tracción y el módulo elástico. Redujo la permeabilidad del agua. Aplicación: envases para comida.	Hosseini <i>et al.</i> (2015)
Composites de poliuretano con refuerzo de fibras de quitosano	Aumento del módulo elástico sin afectar a la memoria de forma. Aplicación: materiales de ortodoncias.	Kawaguchi <i>et al.</i> (2017)
Films de papaya con refuerzo de nanopartículas de quitosano	Mejora de la resistencia a la tracción, a la tensión a la rotura y mejora de las propiedades barrera de vapor de agua. Aplicación: envases de comida.	de Barros-Alexandrino <i>et al.</i> (2019)
Esponja de carboximetilcelulosa reforzadas con micropartículas de quitosano	Mejora la resistencia a la compresión y la porosidad. Mejora, también de las propiedades antimicrobianas. Aplicación: cicatrización de heridas.	Tu <i>et al.</i> (2019)

Las formas en las que se encuentra el quitosano como refuerzo en el material son diversas: fibras, micropartículas, nanofibras o nanopartículas (Tabla 2.4). En todos los casos se mejoran las propiedades mecánicas de los materiales y se aumentan las propiedades antibacterianas o de permeabilidad del agua. Las aplicaciones de estos materiales reforzados con quitosano se centran en medicina/farmacia y en el envasado de alimentos. En la presente tesis doctoral se ha seleccionado el quitosano en micropartículas como refuerzo de los ionogeles y bionogeles para su uso en el área médico/farmacéutica. Se han empleado micropartículas debido a que el procedimiento de obtención de éstas requiere muchas menos etapas de producción que en el caso de utilizar partículas de tamaño de nanómetros o fibras (Hosseini *et al.*, 2015; Tu *et al.*, 2019).

A photograph of a petri dish containing a bacterial culture. The agar surface is covered with a dense, greenish-yellow, fuzzy growth, likely a mold or yeast. The dish is tilted, and the background is a neutral, light color.

Capítulo 3
Planteamiento de la tesis doctoral

3. Planteamiento de la tesis doctoral

Para la consecución del objetivo principal de la presente tesis doctoral ésta se ha dividido en cuatro bloques principales (Figura 3.1), que integran, a su vez, los diferentes planteamientos para la obtención de los objetivos específicos señalados en el Capítulo 1 (Figura 3.2).



Figura 3.1. Esquema por bloques de la tesis doctoral

- **Grado de desacetilación del quitosano.** En este bloque se seleccionó la técnica para la determinación del DD del quitosano utilizada a lo largo de la presente tesis doctoral. Esta determinación se realizó mediante el uso de un quitosano de referencia cuyo DD era conocido. Este bloque responde al objetivo específico 1.
- **Obtención y caracterización de los quitosanos utilizados como refuerzo.** Se obtuvieron quitosanos con diferentes DD a partir de quitina con distintas concentraciones de reactivo (NaOH) para, posteriormente, determinar una relación entre la concentración de reactivo y el DD. Con dicha relación, se obtuvieron los quitosanos con los DD específicos para la formulación de los ionogeles y bionogeles reforzados (objetivo específico 2). Dichos

quitosanos se caracterizaron de acuerdo con el procedimiento incluido en la Publicación I (cristalinidad y comportamiento térmico) y en la Publicación II (peso molecular promedio viscoso) que se recogen en el Anexo II.

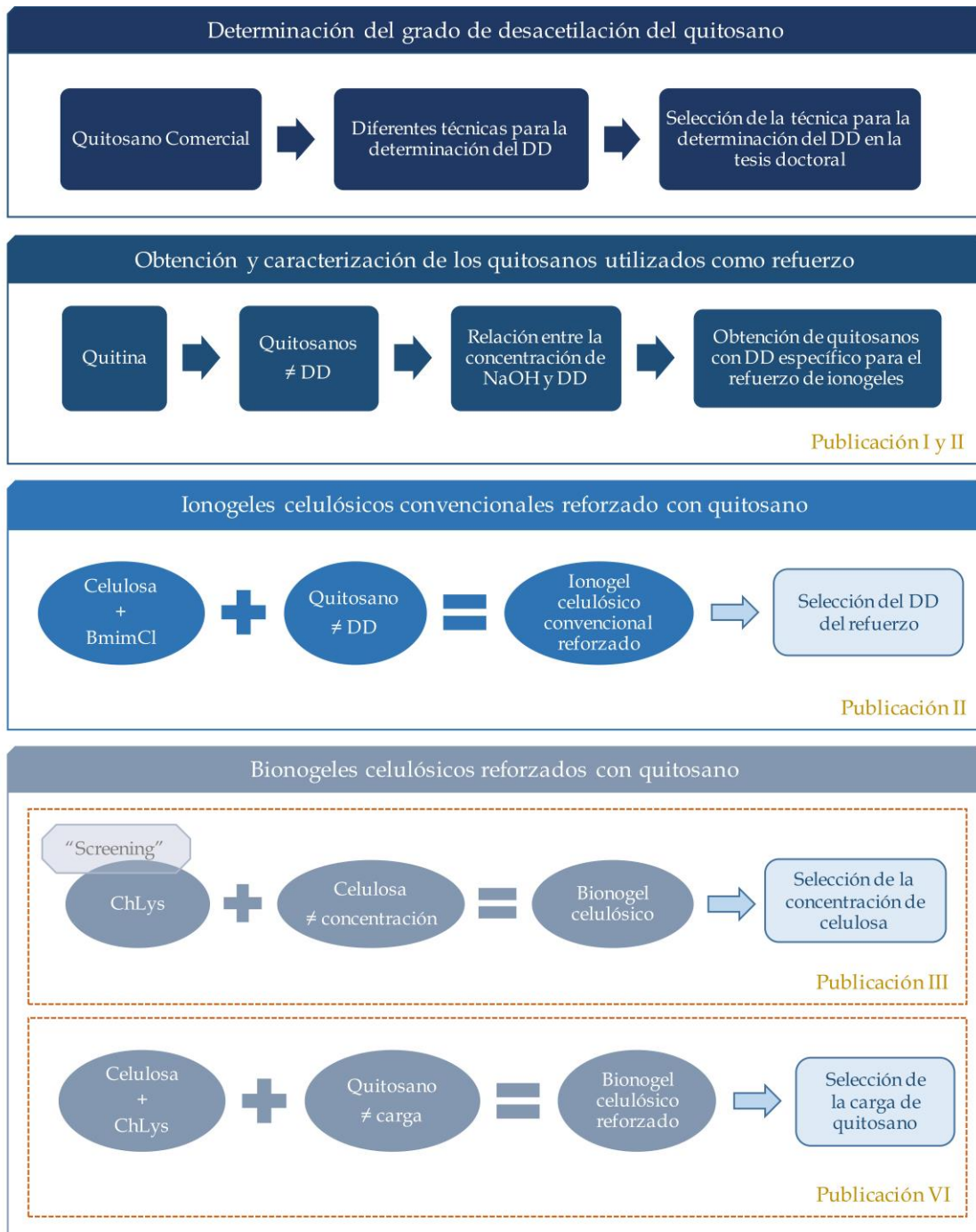


Figura 3.2. Planteamiento de la tesis doctoral

Publicación I: Villar-Chavero, M. M., Domínguez, J. C., Alonso, M. V., Oliet, M. y Rodríguez, F. (2018). Thermal and kinetics of the degradation of chitosan with different deacetylation degrees under oxidizing atmosphere. *Thermochimica Acta*, 670, 18-26.

Publicación II: Villar-Chavero, M. M., Domínguez, J. C., Alonso, M. V., Oliet, M. y Rodríguez, F. (2019). Tuning the rheological properties of cellulosic ionogels reinforced with chitosan: The role of the deacetylation degree. *Carbohydrate Polymers*, 207, 775-781.

- **Ionogel celulósicos convencionales reforzados con quitosano.** En este bloque se persigue el objetivo de determinar la influencia del DD del quitosano en las propiedades reológicas y térmicas del ionogel celulósico convencional reforzado (objetivo específico 3). Para ello, se formularon ionogel de celulosa y BmimCl, reforzados con quitosano con diferentes DD. A partir de la caracterización de los ionogel formulados, se seleccionó aquél cuyo DD del quitosano ofreció las mejores propiedades reológicas (mayores módulos). Los resultados de este bloque se encuentran recogidos en la Publicación II (Anexo II).
- **Bionogel celulósicos reforzados con quitosano.** Por último, el cuarto bloque busca la consecución de los objetivos específicos 4-6. En primer lugar, se seleccionó mediante un *screening* el líquido iónico de base biológica de 3ª generación para la formulación de los bionogel. Después, fueron formulados los bionogel celulósicos sin reforzar con diferentes concentraciones de celulosa para seleccionar la que maximizara las propiedades reológicas de los mismos. Una vez realizada esta selección, en segundo lugar, se desarrollaron los bionogel celulósicos reforzados con quitosano con diferentes cargas de refuerzo, siendo la matriz de estos bionogel el bionogel celulósico elegido con anterioridad. Se escogió aquella carga cuyas mejores propiedades reológicas aportó al bionogel. También se caracterizaron las propiedades antimicrobianas de los bionogel para conocer su capacidad antibacteriana. Cabe destacar que el DD del quitosano utilizado para la formulación de estos bionogel fue el seleccionado en el bloque anterior. Los resultados de los bionogel sin reforzar se encuentran en la Publicación III, mientras que los de los bionogel reforzados con quitosano se recogen en la Publicación IV, ambas en el Anexo II.

Publicación III: Villar-Chavero, M. M., Domínguez, J. C., Alonso, M. V., Rigual, V., Oliet, M. y Rodríguez, F. (2019). Viscoelastic properties of physical cellulosic bionogel of cholinium lysinate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 262-269.

Publicación IV: Villar-Chavero, M. M., Domínguez, J. C., Alonso, M. V., Oliet, M. y Rodríguez, F. Chitosan-reinforced cellulosic bionogel: viscoelastic and antibacterial properties. Pendiente de publicación.



Capítulo 4

Grado de desacetilación del quitosano

4. Grado de desacetilación del quitosano

En este capítulo se estudian algunas de las técnicas y métodos más utilizados para el cálculo del grado de desacetilación del quitosano (DD) para seleccionar aquella más adecuada primando criterios como el estado físico o la cantidad de muestra, el tiempo de medida y la precisión y fiabilidad de los resultados.

4.1. Planteamiento experimental, materiales y reactivos

En la Figura 4.1 se representa el procedimiento experimental llevado a cabo para la determinación del DD con una muestra de quitosano comercial.

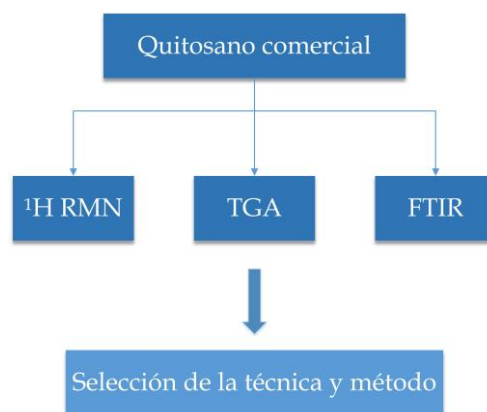


Figura 4.1. Planteamiento experimental para la selección de la técnica y el método para la obtención del DD

Las técnicas de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN), termogravimetría (TGA) y espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) se

emplearon para determinar el DD de un quitosano comercial de referencia. Para las técnicas de TGA y FTIR, la muestra se analizó en estado sólido, mientras que para la técnica de ^1H RMN es necesaria la disolución previa del quitosano. Los métodos aplicados para el cálculo del DD en cada técnica fueron seleccionados entre los más utilizados en la bibliografía (apartado 2.4.2.1). La selección de la técnica y método para la determinación del DD se ajustó a los criterios de cantidad mínima de muestra requerida, tiempo de medida corto y a la mínima desviación estándar (SD).

El quitosano comercial utilizado en esta experimentación, en polvo, procedía del exoesqueleto de cangrejos adquirido a la empresa Sigma-Aldrich (código 28191) con un DD de 86,5 %. En la Tabla 4.1 se recogen los reactivos empleados en la experimentación, junto a su pureza, procedencia y calidad.

Tabla 4.1. Reactivos empleados en la selección de la técnica y método de determinación del DD

Reactivo	Pureza (%)	Procedencia	Calidad
DCI	99	Sigma-Aldrich	RMN
D ₂ O	99,9	Sigma-Aldrich	RMN
KBr	-	PanReac	IR*

* Análisis infrarrojo

4.2. Procedimiento experimental para la determinación del grado de desacetilación

A continuación, se describen las condiciones y los equipos utilizados para la determinación del DD del quitosano comercial de referencia.

4.2.1. Resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN)

El espectrómetro utilizado para llevar a cabo el análisis de la muestra es fue Bruker AV. 500 MHz, cuyo funcionamiento se basa en el empleo de pulsos con Transformada de Fourier. Para el tratamiento de los datos obtenidos se utilizó el programa el programa informático MestreNova.

El análisis se realizó a dos temperaturas diferentes, la propuesta por Lavertu *et al.* (2003) para una temperatura de trabajo de 27 °C, y la propuesta por Fernandez-Megia *et al.* (2005), cuya temperatura del ensayo es de 70 °C. Las muestras se prepararon en función de dichas condiciones de análisis. Para el ensayo realizado a 27 °C se añadieron 5 mg de quitosano a una disolución al 2 % de DCI/D₂O con agitación, llevándola a 60 °C durante 5 h para su disolución completa. Para poder realizar el análisis a la temperatura fijada, es necesario que la disolución con quitosano se enfríe hasta temperatura ambiente. A continuación, se tomó una alícuota de 0,5 mL para llevarla al tubo de medida del espectrómetro y realizar, de esta forma, el ensayo en las condiciones propuestas. Para la medida a 70 °C se procede de la misma forma que en el caso anterior, exceptuando la etapa de calentamiento para la disolución del quitosano que es innecesaria. Además, una vez se encuentre la

probeta en el interior del espectrómetro, es necesario, para comenzar el ensayo, esperar un tiempo de residencia para que la muestra alcance la temperatura de 70 °C (más de 2 h). Por este motivo, estas condiciones suponen un tiempo de medida menor que en el caso anterior.

El cálculo del DD se determinó mediante las relaciones de las superficies de las integrales de los picos del espectro de los grupos acetilados frente a los de los grupos amino del polímero. Para dicha determinación se utilizó la Ecuación 4.1, propuesta por Hirai *et al.* (1991):

$$DD = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{1}{3} \cdot I_{H-Ac} \right) / \left(\frac{1}{6} \cdot I_{H2-6} \right) \right] \right\} \cdot 100 \quad [4.1]$$

donde I_{H-Ac} representa la superficie de la integral de la señal de resonancia del protón perteneciente al grupo aceto, tomando como intervalo de cálculo de dicha integral 1,7-2,2 ppm; y I_{H2-6} es la integral de las señales de resonancia de los protones de los anillos del polímero acetilado. En este último caso se escoge el intervalo de 2,8-4,1 ppm.

4.2.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico del quitosano de referencia se llevó a cabo en un analizador termogravimétrico de horno horizontal TGA/STDA 851^e Mettler-Toledo, cuyo programa informático para el registro de los datos es el STAR^e (Mettler-Toledo). La balanza que posee este equipo tiene una precisión de 1 µg. La muestra de quitosano se añadió a un crisol de alúmina de 70 µL, sin tratamiento previo. En la Tabla 4.2 se recogen las condiciones del ensayo realizado propuestas por Alonso *et al.* (1983).

Tabla 4.2. Condiciones de operación para el ensayo TGA para la determinación del DD (Alonso *et al.*, 1983)

Cantidad de muestra inicial (mg)	10-12
Velocidad de calentamiento (°C/min)	10
Intervalo de temperatura de barrido (°C)	30-950
Caudal del gas de reacción (mL/min Aire)	20
Caudal el gas de protección (mL/min N₂)	20

La determinación del DD se efectuó tomando el valor de pérdida de masa correspondiente al mínimo absoluto de la primera derivada del termograma (DTG) obtenido, es decir, el valor de pérdida de masa donde se da la máxima velocidad de degradación. Este valor se introdujo en la Ecuación 4.2, propuesta por Alonso *et al.* (1983) para la obtención de dicho grado:

$$DD = 100 - (0,28 \cdot \Delta m - 0,23) \quad [4.2]$$

donde Δm es el porcentaje de pérdida de masa de la muestra de quitosano en base seca.

4.2.3. Espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

El ensayo de espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) se realizó en el equipo Jasco FT/IR-4600. La muestra de quitosano comercial, previamente secada en estufa a 100 °C durante 2 h, se mezcló con KBr en un mortero de ágata. Después, esta mezcla se llevó a la prensa hidráulica marca Specac de Atlas para producir la pastilla que posteriormente se introdujo en el equipo para su medición. La fuerza aplicada para este fin fue de 7-8 toneladas durante 30 s. Para obtener una mayor reproducibilidad de la medida, se realizaron 3 réplicas del ensayo.

Las condiciones de medida de las pastillas formadas fueron las propuestas por Brugnerotto *et al.* (2001b), es decir, la relación entre la masa de muestra y la cantidad de KBr de 1/100, 64 barridos, la resolución de 2 cm⁻¹ y un intervalo de medida de 4000-400 cm⁻¹. Empleando el calibrado realizado por Brugnerotto *et al.* (2001b) con muestras de diversas procedencias y un amplio intervalo de DD se puede determinar el DD del quitosano comercial mediante la Ecuación 4.3:

$$DD = 100 - \left[\left(\frac{A_{1320}}{A_{1420}} - 0,3822 \right) / 0,03133 \right] \quad [4.3]$$

donde A_{1320} es la absorbancia para la banda de 1320 cm⁻¹ y A_{1420} es la absorbancia de la banda de 1420 cm⁻¹. La primera corresponde a una banda específica del monómero *N*-acetil-D-glucosamina y la segunda a una banda de referencia especificada por Brugnerotto *et al.* (2001b), al igual que las líneas de base para tomar los valores de dichas absorbancias. A su vez, las absorbancias A_{1320} y A_{1420} se calcularon mediante la Ecuación 4.4 (Sabnis y Block, 1997):

$$A_{1320 \text{ ó } 1420} = \log \left(\frac{\% T \text{ desde el eje de abcisas a la línea base}}{\% T \text{ desde el espectro al eje de abcisas}} \right) \quad [4.4]$$

donde %T es el tanto por ciento de transmitancia obtenido en el ensayo.

4.3. Resultados experimentales y discusión

En este epígrafe se exponen los resultados experimentales obtenidos del DD del quitosano comercial con las diferentes técnicas y métodos utilizados, así como su discusión. Finalmente, se seleccionará la técnica y el método más adecuado para la determinación del DD.

En los apartados del 4.3.1. al 4.3.3 se exponen los resultados obtenidos de la determinación del DD con las técnicas de ¹H RMN, TGA y FTIR, así como una breve descripción de los datos estructurales y térmicos aportados en estos ensayos.

4.3.1. Grado de desacetilación por ^1H RMN

En la Figura 4.2 se muestran los espectros del quitosano obtenidos mediante el análisis ^1H RMN a las temperaturas estudiadas. En dichos espectros se pueden encontrar los picos correspondientes a la resonancia de los enlaces de protones de la muestra. El espectro del quitosano es una superposición de los espectros de los monómeros que lo conforman, ligeramente modificados debido a las interacciones de las resonancias.

La señal entre 1,8 y 2,1 ppm representa tres protones del monómero acetil glucosamina, mientras que la señal 2,8-3,2 ppm corresponde al protón de la posición 2 de la glucosamina. Los protones no anoméricos que se encuentran unidos al esqueleto del anillo en un residuo glicosilo tienen densidades de electrones similares y, por tanto, cambios químicos también parecidos. Las señales de los protones no anoméricos (3,3-4,2 ppm) se solapan parcialmente y producen una amplia envolvente de señales en el centro del mismo. Los protones anoméricos (posición 1 de los grupos acetilados y no acetilados) obedecen a los cambios químicos más intensos debido al oxígeno vecino y al anillo de los monómeros. Los protones en posición 1 del grupo acetilado (1A) resuenan a, aproximadamente, 4,4-4,6 ppm, mientras que los no acetilados (1D) lo hacen en la señal de 4,7-4,9 ppm (Kasaai, 2009).

La diferencia más notable entre los espectros tomados a las temperaturas de ensayo se corresponde con el cambio de la señal del disolvente, pues en el espectro a 27 °C resuena a 5 ppm, mientras que en el espectro a 70 °C lo hace a 4,7 ppm. Este hecho se debe a la propia temperatura del ensayo. También se puede observar en la Figura 4.2b el solapamiento del disolvente con la señal del protón en posición 1 del grupo acetilado.

La determinación del DD se ha realizado mediante la integral de las señales del H-Ac y las de H 2-6 con 2(D). En la Tabla 4.3 se recogen los resultados de las integrales y el valor del DD obtenido mediante la aplicación de la Ecuación 4.1.

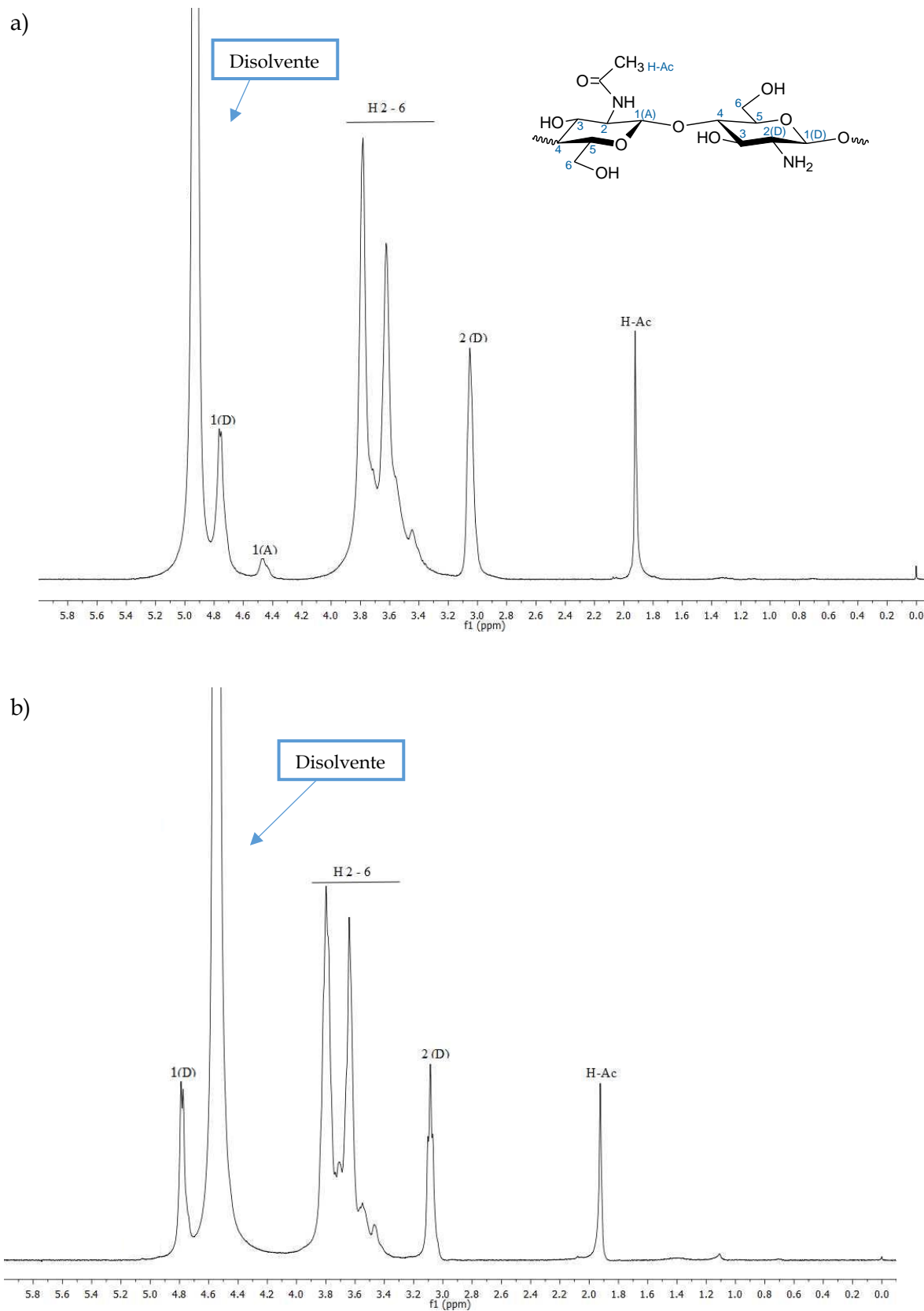


Figura 4.2. Espectro de ^1H RMN del quitosano comercial a) 27°C y b) 70°C

Tabla 4.3. Valores de las integrales de las señales para la determinación del DD del quitosano comercial mediante ^1H RMN y sus resultados

	T=27 °C	T=70 °C
$I_{\text{H-Ac}}$	30420	23247
$I_{\text{H 2-6}}$	439972	338741
DD \pm SD* (%)	86,2 \pm 0,2	86,3 \pm 0,3

* SD: desviación estándar

Los valores obtenidos de DD a partir de los espectros a diferentes condiciones de temperatura no muestran diferencias significativas entre ellos, variando sus valores medios en torno al 0,12 %, como se puede observar en la Tabla 4.3. El intervalo del DD obtenido mediante el ensayo a la temperatura de 70 °C incluye el valor del DD de referencia (86,5 %). Por otra parte, el ensayo realizado a la temperatura de 27 °C proporciona un intervalo de DD que excluye el valor de referencia, cometiendo un error menor al 0,35 %. Pese a que el DD calculado a esta temperatura no coincida con el del quitosano comercial, este error se puede considerar muy bajo, por lo que la técnica para la determinación del DD mediante estas condiciones también se considera adecuada (Fernandez-Megia *et al.*, 2005).

4.3.2. Grado de desacetilación por TGA

En la Figura 4.3 se muestra el termograma (TG) obtenido del quitosano comercial de referencia, junto con la derivada del citado termograma (DTG). En este termograma se pueden identificar las tres etapas de degradación a las que se ve sometido el quitosano en ausencia de oxígeno. La primera etapa, en el intervalo de 30-130 °C, se corresponde con la eliminación del agua físicamente absorbida en la muestra (Corazzari *et al.*, 2015). La pérdida de masa en este intervalo se encuentra en torno al 7 %.

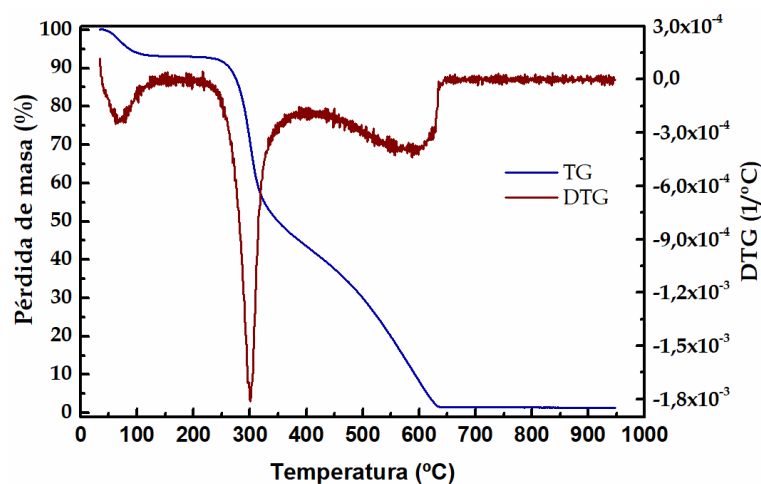


Figura 4.3. Curva TGA y DTG del quitosano de referencia

La pérdida de masa correspondiente a la segunda etapa (130-400 °C) es de, aproximadamente, el 50 %, y está causada por la descomposición/despolimerización de las cadenas del polímero mediante la desacetilación y la división de los enlaces glucosídicos; en primer lugar, se produce la degradación de los grupos Glc y, posteriormente, la descomposición de los grupos GlcNAc (Alonso *et al.*, 1983; Nam *et al.*, 2010; Corazzari *et al.*, 2015; Moussout *et al.*, 2016). La última etapa, entre 400 y 650 °C, corresponde a la degradación térmica del anillo de piranosa y del carbono residual (Martínez-Camacho *et al.*, 2010).

La determinación del DD mediante esta técnica se realizó sustituyendo en la Ecuación 4.2 el valor de la pérdida de masa (en base seca) debida a la despolimerización por la desacetilación a 300 °C (mínimo de la curva DTG para el proceso de despolimerización). En la Tabla 4.4 se recogen los resultados de la pérdida de masa en base seca, junto al valor del DD obtenido.

Tabla 4.4. Resultados de la pérdida de masa en base seca para el proceso de desacetilación y valor del DD del quitosano de referencia mediante TGA

Temperatura DTG (°C)	Pérdida de masa (%)	Pérdida de agua (%)	Δm (%)	DD \pm SD* (%)
300	71,0	6,9	64,1	82,3 \pm 0,9

* SD: desviación estándar.

En este caso, el DD difiere más con el valor de DD del quitosano comercial de referencia, siendo el error cometido cercano al 5 %. Este error es aproximadamente 17 veces mayor en comparación con el cometido en la obtención del DD mediante la técnica de resonancia magnética nuclear de protón a 70 °C.

4.3.3. Grado de desacetilación por FTIR

En la Figura 4.4a se muestra el espectro FTIR del quitosano comercial. Para poder distinguir mejor las bandas implicadas en el cálculo del DD, en la Figura 4.4b se muestra una ampliación de dicho espectro correspondiente a la zona de interés, que incluye las bandas de 1320 y 1420 cm^{-1} , características para la determinación del DD del quitosano. En la Figura 4.4b también se incluyen las líneas base utilizadas.

Una de las bandas más representativas de este polímero es la correspondiente a 3450 cm^{-1} , que se debe al estiramiento N-H para la amida I y a la banda ancha de vibración-tensión de los grupos hidroxilo (Escobar Sierra *et al.*, 2014; Moussout *et al.*, 2016). La región espectral entre 3000 y 2800 cm^{-1} se asocia con los estiramientos simétricos y asimétricos del enlace C-H del anillo y de los grupos CH_2OH y CH_3 . La banda a 1660 cm^{-1} corresponde al solapamiento de las vibraciones del estiramiento de C-N y de los grupos C=O de la amida I (Singh *et al.*, 2009). La banda de 1380 cm^{-1} se debe a la deformación simétrica de los grupos CH_3 , mientras que la localizada en 1320 cm^{-1}

corresponde a la deformación CO-NH del grupo CH₂ de la amida III (Figura 4.4b), circunstancia que determina el paso de amida a amina (Brugnerotto *et al.*, 2001b). Por ello, es esta banda la que se escoge para establecer el valor del DD. Por último, a 1035 cm⁻¹ se encuentra la banda relacionada con los estiramientos del puente de oxígeno de la unidad de Glc (López *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2009; Kumirska *et al.*, 2010; Escobar Sierra *et al.*, 2014).

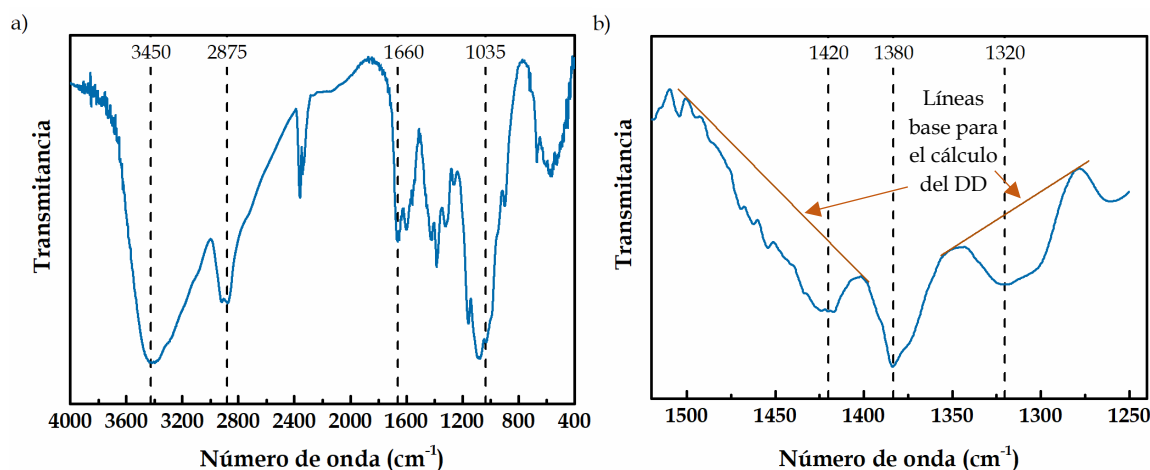


Figura 4.4. (a) Espectro FTIR del quitosano comercial de referencia y (b) ampliación del espectro entre 1240 y 1520 cm⁻¹

En la Tabla 4.5 se recogen los datos necesarios para la determinación del DD, así como el valor de éste calculado mediante las Ecuaciones 4.3 y 4.4.

Tabla 4.5. Absorbancias de las bandas de 1320 y 1420 cm⁻¹ y valor del DD del quitosano de referencia calculado mediante FTIR

T ₁₃₂₀ (%)	T ₁₄₂₀ (%)	A ₁₃₂₀	A ₁₄₂₀	DD ± SD* (%)
71,5	69,4	2,2 · 10 ⁻²	2,7 · 10 ⁻²	86,3 ± 0,3

*SD: desviación estándar

El DD obtenido mediante FTIR se encuentra dentro del intervalo de confianza del DD del quitosano comercial de referencia (Tabla 4.5), por lo que esta técnica también se considera adecuada para dicha determinación.

4.3.4. Selección de la técnica para la determinación del grado de desacetilación

En la Tabla 4.6 se recogen los resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas utilizadas, junto al valor del DD del quitosano comercial de referencia. Todas las técnicas presentan buenos resultados, aunque cabe destacar que la que mayor error ofrece es la determinación mediante TGA, con un 5 % de error. Los resultados que más se aproximan al valor de referencia o que incluyen en su intervalo de confianza dicho valor fueron los determinados mediante ¹H RMN a 70 °C y FTIR, por ello se eligieron éstas por su valor mínimo de desviación estándar. Para la elección entre una de

estas dos técnicas para determinar el DD, se han considerado otros parámetros como son el estado físico de la muestra, el tiempo de medida (incluyendo el tiempo de preparación de la muestra) y la cantidad de muestra necesaria para el ensayo.

Tabla 4.6. DD del quitosano comercial calculado con las diferentes técnicas propuestas

Técnica	DD \pm SD* (%)
¹ H RMN a 27 °C	86,2 \pm 0,2
¹ H RMN a 70 °C	86,3 \pm 0,3
TGA	82,3 \pm 0,9
FTIR	86,3 \pm 0,3
Referencia	86,5

* SD: desviación estándar.

En la Tabla 4.7 se muestra una comparativa de estos parámetros para las diferentes formas de determinación del DD empleadas. Estos parámetros se han valorado como alto, medio y bajo, excepto en el caso del estado físico de la muestra que se ha indicado.

Tabla 4.7. Evaluación de las técnicas de ¹H RMN a 70 °C y FTIR para la determinación de DD del quitosano de referencia

Parámetro	¹ H RMN 70°C	FTIR
Estado de la muestra	Solubilizada	Sólida
Tiempo de medida	Alto	Bajo
Cantidad de muestra	Bajo	Bajo

El estado físico de la muestra es un factor muy importante debido a la baja solubilidad del quitosano por las interacciones hidrófobas e hidrófilas que se producen en las cadenas de dicho polímero (Kasaai, 2009). Por tanto, en la técnica de ¹H RMN es necesario que éste se encuentre completamente disuelto para la medida de su DD. Por este motivo, se prefiere que la muestra se encuentre en estado sólido y, de esta forma, se evite un tratamiento previo prolongado. El tiempo de medida para el ensayo de ¹H RMN a 70 °C es mayor que en el ensayo en FTIR debido a que en la resonancia magnética nuclear se debe esperar a que la muestra alcance la temperatura fijada. En los dos casos, la cantidad de muestra que se necesita es baja, de 5 mg para resonancia magnética nuclear y de 2 mg para FTIR.

En conclusión, debido a que no se necesita tratamiento previo de la muestra y a que el tiempo necesario para el ensayo es menor, así como la cantidad de muestra necesaria, se ha elegido la técnica de FTIR para la determinación del DD como la más adecuada.



Capítulo 5
Obtención y caracterización de los
quitosanos utilizados como refuerzo

5. Obtención y caracterización de los quitosanos utilizados como refuerzo

En este capítulo se va a describir el planteamiento experimental, los materiales y los reactivos necesarios para la obtención de los quitosanos a partir de quitina; que posteriormente se utilizarán como refuerzo de los ionogeles y bionogeles. A continuación, se expondrá el procedimiento llevado a cabo para la obtención de los quitosanos. Después, se mostrarán los resultados y discusión tanto de la relación de la concentración de sosa utilizada en la reacción de desacetilación de la quitina con el DD del quitosano, como de la caracterización realizada a los quitosanos obtenidos.

5.1. Planteamiento experimental, materiales y reactivos

El procedimiento experimental llevado a cabo en este capítulo se ha dividido en dos bloques, tal como se muestra en la Figura 5.1. En el primer bloque se estudia la reacción de desacetilación de la quitina con diferentes concentraciones de NaOH, entre un 37 y un 52 % en peso. Los quitosanos obtenidos a través de la reacción de desacetilación se caracterizaron mediante FTIR (técnica seleccionada en el Capítulo 4) para determinar su DD y, de esta forma, poder relacionarlo con la concentración de sosa utilizada. Una vez obtenidos los quitosanos para las concentraciones de NaOH empleadas y determinado su DD, se realizó una regresión no lineal que permitió correlacionar la concentración de NaOH con el DD.

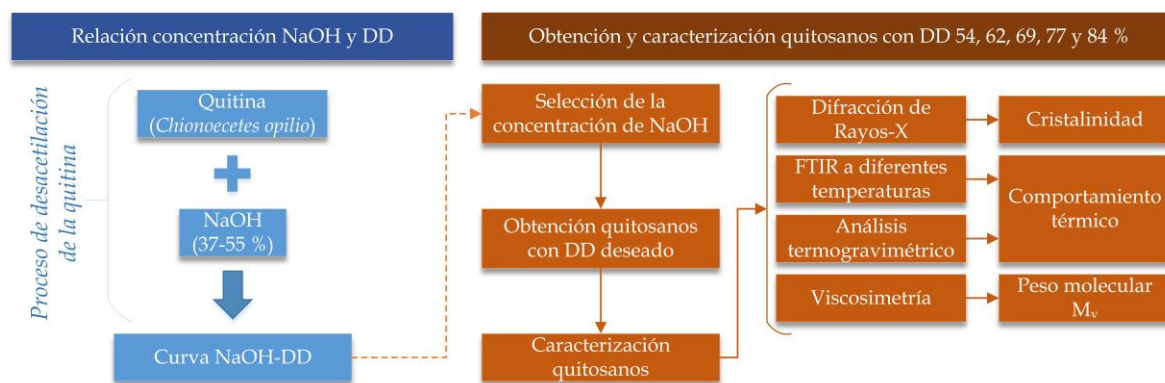


Figura 5.1. Planteamiento experimental de la obtención de quitosanos para los refuerzos de materiales

El segundo bloque es el referido a la obtención y caracterización de los quitosanos, utilizados posteriormente como refuerzos, con un DD del 54, 62, 69, 77 y 84 %. Para ello, en primer lugar, se seleccionaron las concentraciones de NaOH que permitían la obtención de quitosanos con dichos DD. A continuación, se obtuvieron los quitosanos y se comprobó que su DD era el correcto mediante FTIR. Después, éstos fueron caracterizados mediante difracción de rayos-X para conocer su grado de cristalinidad y a través de FTIR y análisis termogravimétrico para determinar su comportamiento térmico; por último, se empleó la viscosimetría para obtener sus pesos moleculares promedios (M_v).

La quitina utilizada para el proceso de desacetilación procede del exoesqueleto del cangrejo de las nieves (*Chionoecetes opilio*), adquirida de la empresa G.T.C. Bio Corporation (China), con el código CP01 y un DD del 5,2 %. En la Tabla 5.1 se recogen los reactivos empleados tanto en el proceso de desacetilación como en las diferentes caracterizaciones de los quitosanos obtenidos.

Tabla 5.1. Reactivos empleados en la obtención y caracterización de los quitosanos utilizados como refuerzos

Reactivo	Pureza (%)	Marca	Calidad
NaOH	98-100,5	PanReac	Grado Ph. Eur.
KBr	-	PanReac	IR
CH ₃ COOH	99,5-100,5	Panreac	Grado Ph. Eur.
NaCH ₃ COO	≥ 99	Sigma-Aldrich	Grado Ph. Eur.

5.2. Procedimiento para la obtención y caracterización de los quitosanos

A continuación, se detalla el procedimiento de obtención de los quitosanos a partir de quitina mediante su desacetilación. Asimismo, se describen las técnicas utilizadas para la caracterización de los quitosanos obtenidos.

5.2.1. Obtención de quitosano a partir de quitina

En la Figura 5.2 se muestra el proceso de obtención del quitosano con diferentes grados de desacetilación con las etapas que lo componen.

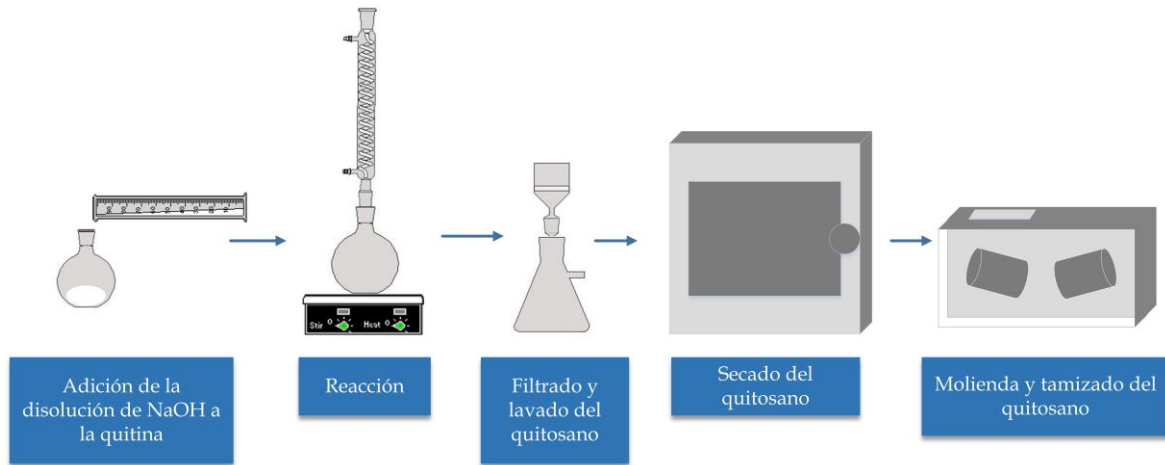


Figura 5.2. Procedimiento para la obtención de quitosanos mediante la desacetilación de la quitina

- Adición de NaOH y reacción de la quitina:

La primera etapa es la adición de NaOH a la quitina en una proporción de 10 g de quitina por cada 300 mL de NaOH en un matraz de fondo plano. Esta proporción es la que recomiendan Yen *et al.* (2009) para la quitina procedente del cangrejo de las nieves. La concentración de NaOH varía en función del experimento llevado a cabo. Así, para la obtención de la curva concentración de NaOH-DD, se utilizaron concentraciones del 37; 37,3; 38; 39; 39,5; 40; 45; 50 y 52 % en peso.

La segunda etapa corresponde a la reacción de desacetilación. Las condiciones de la reacción fueron seleccionadas para alcanzar un tiempo mínimo de reacción, manteniendo constante la temperatura, para llegar al DD máximo en un único paso de reacción, es decir, aproximadamente un 85 % (Belgacem y Gandini, 2008; Younes *et al.*, 2014). El tiempo se ha fijado en 3 h debido a que, en estudios previos, se obtuvieron valores constantes de DD para las concentraciones más elevadas de NaOH propuestas. Por otra parte, con el fin de que el polímero experimente las mínimas degradaciones durante el proceso de reacción se ha optado por trabajar a 105 °C, que es la temperatura más baja del intervalo (comprendido entre 105 y 160 °C) que proponen los autores en bibliografía (Chang *et al.*, 1997; Kurita, 2001; Methacanon *et al.*, 2003). La agitación empleada para este proceso fue mecánica debido al volumen y la heterogeneidad de las fases implicadas. En la Tabla 5.2 se resumen las condiciones de reacción propuestas para el proceso de desacetilación de la quitina llevado a cabo en la presente tesis doctoral.

Tabla 5.2. Condiciones de la reacción de desacetilación de la quitina

Concentración en peso de NaOH (%)	37-52
Relación quitina/NaOH (g/mL)	1/30
Temperatura de reacción (°C)	105
Tiempo de reacción (h)	3
Método de calefacción	Baño de silicona
Tipo de agitación	Mecánica
Velocidad de agitación (rpm)	900

- Filtrado, lavado y secado del quitosano:

Una vez terminada la reacción, se enfría el matraz hasta la temperatura ambiente y la disolución se filtra en un kitasato a vacío con un embudo büchner esmerilado, cuya placa filtrante tiene una porosidad de 3 (15-40 µm). Una vez filtrado el quitosano, se lava con agua hasta obtener un pH entre 7 y 8. Después, se seca en estufa a 100 °C durante 3 h.

- Molienda y tamizado del quitosano:

Para obtener quitosanos con un tamaño de partícula adecuado, necesario para su uso posterior en el refuerzo de ionogeles y bionogeles, se ha realizado un proceso de molienda y tamizado. La molienda se ha llevado a cabo en un molino de bolas MM301 Retsch con una frecuencia de 30 Hz durante 15 s, para no cambiar las propiedades del quitosano. El tamizado se ha realizado en un tamiz con una luz de paso de 180 µm.

5.2.2. Caracterización de los quitosanos obtenidos

El procedimiento llevado a cabo para la determinación de los DD de los quitosanos obtenidos es el descrito en el Capítulo 4. Además, los quitosanos fueron caracterizados mediante análisis de difracción de rayos-X, FTIR a diferentes temperaturas y análisis termogravimétrico, como se expone a continuación.

5.2.2.1. Difracción de rayos-X

Con el fin de obtener el porcentaje de la parte cristalina de los biopolímeros se determinó el índice de cristalinidad (CrI) de los quitosanos obtenidos. Las condiciones para este análisis están recogidas en la Publicación I (Anexo II). El CrI se determinó de acuerdo con la Ecuación 5.1, propuesta por Focher *et al.* (1990):

$$\text{CrI} = (I_{110} - I_{\text{am}}) \cdot 100 / I_{110} \quad [5.1]$$

donde I_{110} es la intensidad máxima de la red de difracción (en $2\theta \approx 20^\circ$) e I_{am} es la intensidad de la difracción amorfa en las mismas unidades que I_{110} (en $2\theta \approx 16^\circ$).

5.2.2.2. FTIR a diferentes temperaturas

Para conocer los cambios estructurales a los que se ve sometido el quitosano durante su degradación térmica se realizaron análisis de espectroscopía FTIR a diferentes temperaturas. En primer lugar, las muestras de quitosano fueron degradadas en una termobalanza Mettler-Toledo TGA/STDA 851^e. A continuación, se realizaron las mediciones mediante FTIR. En la Publicación I del Anexo II de la tesis doctoral se encuentran descritas las condiciones de los ensayos realizados.

5.2.2.3. Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico se efectuó en un equipo Mettler-Toledo TGA/STDA 851^e con el objetivo de determinar la estabilidad térmica de los quitosanos obtenidos. Dicha estabilidad se definió como la temperatura al 25 % de la conversión (α) en base seca ($T_{25\%}$). El intervalo utilizado para todos los ensayos fue de 30 a 950 °C con unas velocidades de calentamiento de 6, 8, 10, 12 y 14 °C/min. Los resultados de TGA se expresaron como conversión frente a temperatura, donde la conversión es la relación entre la pérdida de masa a un tiempo t y la pérdida de masa total al final del ensayo. Las condiciones de este ensayo se describen en la Publicación I (Anexo II).

5.2.2.4. Viscosimetría

El ensayo para determinar el peso molecular promedio viscoso (M_v) se llevó a cabo en un viscosímetro capilar Cannon Fenske 100 sumergido en un baño de agua a una temperatura de 30 °C. Las muestras de quitosano se prepararon de acuerdo con las condiciones descritas en la Publicación II del Anexo II. El M_v se calculó de acuerdo con la metodología propuesta por Wang *et al.* (1991) mediante la determinación de la viscosidad intrínseca (η), utilizando la ecuación de Mark-Houwink:

$$\eta = K \cdot M_v^n \quad [5.2]$$

donde los parámetros K y n son función del DD y se definen de acuerdo con las expresiones 5.3 y 5.4 que se indican a continuación:

$$K = 1,64 \cdot 10^{-30} \cdot DD^{14} \quad [5.3]$$

$$n = -1,02 \cdot 10^{-2} \cdot DD + 1,82 \quad [5.4]$$

5.3. Resultados experimentales y discusión

A continuación, se recogen los resultados y discusión obtenidos de la relación entre la concentración de NaOH y DD, así como los valores de concentración de sosa necesarios para la

obtención de los quitosanos con DD entre 54 y 84 %, que se utilizarán posteriormente como refuerzo de ionogeles y bionogeles. También se exponen los resultados y discusión de la caracterización de los quitosanos obtenidos en función de su grado de desacetilación.

5.3.1. Relación entre la concentración de NaOH y el DD

En la Figura 5.3 se muestran los espectros FTIR de los quitosanos obtenidos mediante el proceso de desacetilación de la quitina con distintas concentraciones de NaOH utilizadas para obtener la curva NaOH-DD (entre 37 y 52 %, como se detalló en el apartado 5.2.1). En estos espectros se observa que, a medida que se produce una mayor desacetilación debida al aumento de la concentración de NaOH utilizada en el proceso, las bandas características del quitosano (apartado 4.3.3) presentan una mayor intensidad. Este hecho se produce porque los grupos acetilo se van eliminando de la cadena del polímero para formar grupos amina y, por ello, hay una mayor vibración en N-H (banda 3450 cm^{-1}). Lo mismo ocurre con las interacciones debidas a la deformación de la amida II (1560 cm^{-1}) y a la deformación de CO-NH (1320 cm^{-1}). También se puede apreciar una disminución de la intensidad de la banda perteneciente al estiramiento de C-N (1660 cm^{-1}), todo ello propiciado por la reacción de los grupos acetilo.

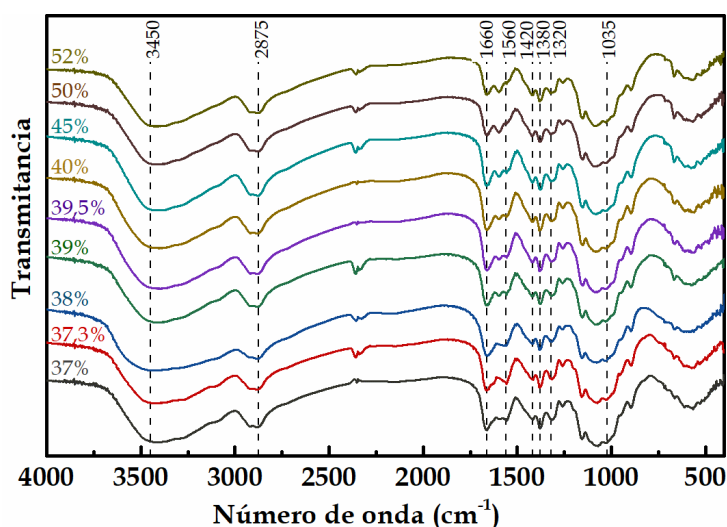


Figura 5.3. Espectros de infrarrojo de los quitosanos obtenidos con concentraciones de NaOH entre 37 y 52 %

A partir de los espectros FTIR obtenidos para cada concentración de sosa y de acuerdo con la Ecuación 4.3, se determinaron los DD de los quitosanos alcanzados. Estos resultados se recogen en la Tabla 5.3, junto con los valores medios de absorbancia para dicha determinación.

Tabla 5.3. Absorbancias medias para la determinación del DD, y grado de desacetilación de los quitosanos obtenidos con concentraciones de NaOH entre 37 y 52 %

NaOH (%)	A_{m1320}	A_{m1420}	DD \pm SD* (%)
37,0	$8,7 \cdot 10^{-2}$	$4,5 \cdot 10^{-2}$	51,08 \pm 0,39
37,3	$8,9 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^{-2}$	55,10 \pm 0,98
38,0	$8,6 \cdot 10^{-2}$	$5,7 \cdot 10^{-2}$	63,46 \pm 0,44
39,0	$7,4 \cdot 10^{-2}$	$5,1 \cdot 10^{-2}$	66,19 \pm 0,99
39,5	$7,5 \cdot 10^{-2}$	$5,8 \cdot 10^{-2}$	70,42 \pm 1,04
40,0	$7,7 \cdot 10^{-2}$	$6,2 \cdot 10^{-2}$	72,65 \pm 0,46
45,0	$5,8 \cdot 10^{-2}$	$5,5 \cdot 10^{-2}$	78,71 \pm 1,81
50,0	$6,3 \cdot 10^{-2}$	$7,1 \cdot 10^{-2}$	83,85 \pm 0,11
52,0	$6,2 \cdot 10^{-2}$	$7,0 \cdot 10^{-2}$	84,01 \pm 0,29

* SD: desviación estándar

En la Figura 5.4 se muestra la representación del DD de los quitosanos frente a la concentración de NaOH, junto con la regresión no lineal aplicada a estos resultados. En esta representación se puede observar cómo, a concentraciones altas de NaOH (50 y 52 %), el DD del quitosano se mantiene constante en torno al 84 %.

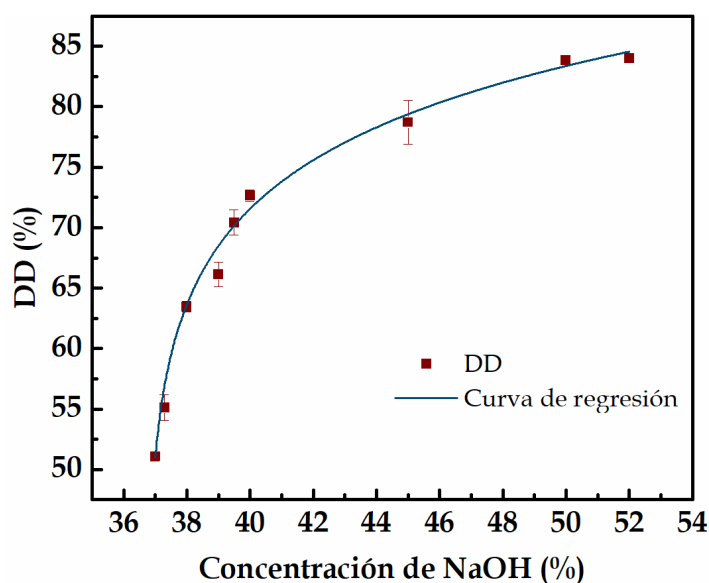


Figura 5.4. Representación del DD de los quitosanos obtenidos frente a la concentración de NaOH

El empleo de una curva de regresión logarítmica aplicada a los datos de DD de los quitosanos obtenidos presentó una buena correlación entre las variables estudiadas, siendo los parámetros de calidad del ajuste R^2 y la desviación estándar de 0,996 y de 1,9, respectivamente. La expresión matemática de la curva de regresión obtenida viene dada por la Ecuación 5.5.

$$DD = 61,47 + 8,47 \cdot \ln([\%NaOH] - 36,71) \quad [5.5]$$

Una vez obtenida la curva de regresión, fue posible determinar las concentraciones de NaOH necesarias para la obtención de los quitosanos con DD de 54, 62, 69, 77 y 84 %. Mediante la Ecuación 5.2 y con los DD fijados, los valores de concentración de NaOH necesarios se recogen en la Tabla 5.4, junto con los valores de DD calculados mediante los espectros FTIR realizados a los quitosanos obtenidos.

Tabla 5.4. Valores de la concentración de NaOH para obtener los quitosanos con distintos DD para el refuerzo de ionogel y bionogel, absorbancias medias para el cálculo del DD y valores de éste junto con el DD objetivo para cada caso

NaOH (%)	A_{m1320}	A_{m1420}	DD experimental \pm SD* (%)	DD teórico (%)
37,1	$1,2 \cdot 10^{-1}$	$6,7 \cdot 10^{-2}$	$53,65 \pm 0,45$	54
37,9	$5,6 \cdot 10^{-2}$	$3,5 \cdot 10^{-1}$	$60,88 \pm 1,32$	62
39,3	$7,7 \cdot 10^{-2}$	$5,7 \cdot 10^{-2}$	$68,76 \pm 0,93$	69
45,0	$5,8 \cdot 10^{-2}$	$5,5 \cdot 10^{-2}$	$78,71 \pm 1,81$	77
52,0	$6,4 \cdot 10^{-2}$	$7,1 \cdot 10^{-2}$	$84,00 \pm 0,29$	84

*SD: desviación estándar

Como se muestra en la Tabla 5.4, la aplicación de la curva de regresión no lineal permite obtener los quitosanos con el DD deseado con un error medio máximo del 2,2 %; con esto se valida la correlación determinada.

5.3.2. Cristalinidad de los quitosanos obtenidos

En la Figura 5.5 se muestran los difractogramas de los quitosanos obtenidos. Para hacer referencia a éstos según su DD, se han nombrado a los quitosanos como C54, C62, C69, C77 y C84 para los DD de 54, 62, 69, 77 y 84 %, respectivamente.

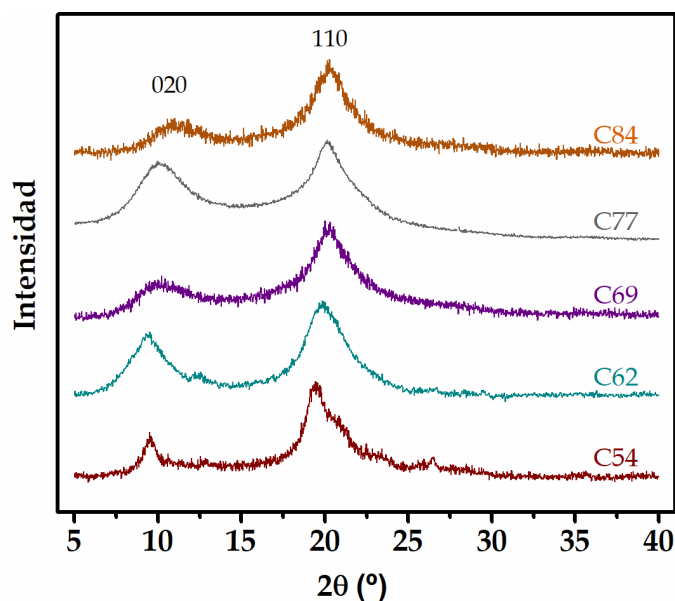


Figura 5.5. Difractogramas de los quitosanos C54, C62, C69, C77 y C84

En el difractograma se pueden apreciar dos picos cristalinos a, aproximadamente, $2\theta=10^\circ$ y $2\theta=20^\circ$, correspondientes a los planos de difracción 020 y 110, respectivamente. Al aumentar el DD del quitosano, el pico correspondiente al plano 020 se redujo y, además, se desplazó a un ángulo más alto ($2\theta>10^\circ$). De la misma forma, el pico del plano 110 disminuyó y se desplazó ligeramente a mayores ángulos de difracción al aumentar el DD de la muestra. Cabe destacar que, para la muestra C54, en el plano 110 se puede observar un solapamiento de picos, resultado típico de muestras con un carácter cristalino elevado como la quitina (Brugnerotto *et al.*, 2001b; Zhang *et al.*, 2005). En la Tabla 5.5 se recogen los índices CrI de los quitosanos obtenidos.

Tabla 5.5. Índices CrI para las muestras de quitosano C54, C62, C69, C77 y C84

Quitosano	CrI \pm SD* (%)
C54	89,6 \pm 2,3
C62	82,6 \pm 3,3
C69	73,6 \pm 2,9
C77	72,3 \pm 2,9
C84	75,7 \pm 3,0

* SD: desviación estándar

A medida que el DD del quitosano aumentó, el índice CrI disminuyó, es decir, se redujo la cristalinidad de la muestra a mayor desacetilación de la quitina. Esto se debe a que las unidades GlcNAc del quitosano presentan una mayor cristalinidad y, por ello, cuantas más unidades haya presentes (menor DD), la cristalinidad del polímero es mayor (muestras C54 y C62) (Abdou *et al.*, 2008; Aranaz *et al.*, 2009). Sin embargo, este hecho no se manifestó para DD mayores del 62 %, ya que la cristalinidad se mantuvo constante entre 72,3 y 75,7 % para las muestras C69, C77 y C84. Esto puede deberse al propio proceso de obtención de los quitosanos, ya que la penetración de la sosa en los cristales de la quitina que causa la escisión de los grupos acetilo puede modificar el orden estructural inicial de las moléculas del polímero (Focher *et al.*, 1990; Baskar y Kumar, 2009). Por ello, aunque se está produciendo la desacetilación de los grupos amino, los quitosanos C69, C77 y C84 muestran índices de cristalinidad similares.

5.3.3. Comportamiento térmico de los quitosanos obtenidos

El estudio del comportamiento térmico de los quitosanos fue necesario debido a que en la formulación de ionogel y bionogel reforzados es necesario utilizar temperaturas cercanas a 100 °C sin que se degrade el polímero. A continuación, se exponen los resultados obtenidos de los estudios de comportamiento térmico tanto del FTIR como en TGA.

5.3.3.1. Estructura química determinada por FTIR a diferentes temperaturas

Los espectros FTIR de los quitosanos obtenidos a temperatura ambiente, 290, 340 y 500 °C se muestran en la Figura 5.6. El motivo de seleccionar dichas temperaturas es para abarcar las diferentes etapas de degradación del quitosano, indicadas en el apartado 4.3.2.

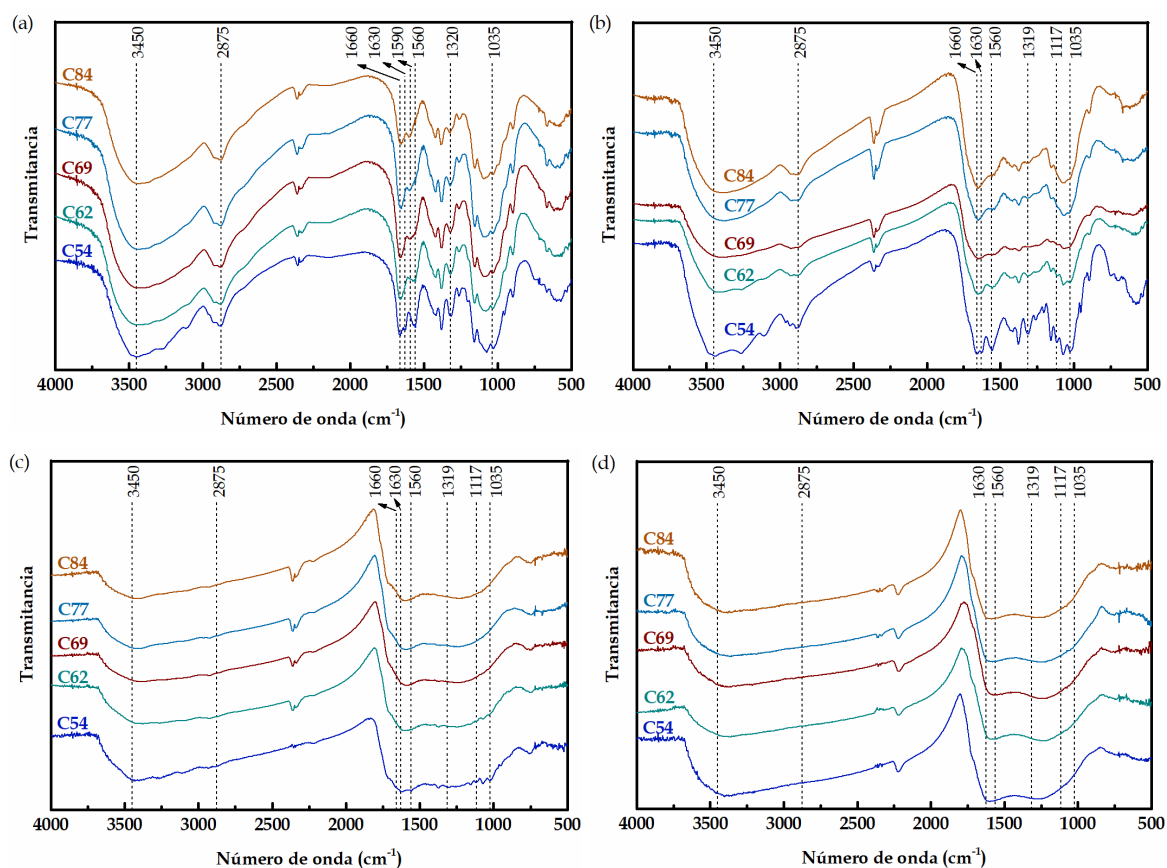


Figura 5.6. Espectros FTIR de las muestras C54, C62, C69, C77 y C84 (a) temperatura ambiente, (b) 290 °C, (c) 340 °C y (d) 500 °C

Los espectros FTIR a temperatura ambiente (Figura 5.6a) de las muestras C62 a C84 presentan las mismas bandas representativas del quitosano de referencia utilizado para la selección de la técnica de determinación del DD, cuya discusión se realizó en el apartado 4.3.3. Cabe destacar ciertas diferencias entre las citadas muestras y la muestra C54. En esta muestra, se puede apreciar una banda a 1560 cm⁻¹, que corresponde al estiramiento o deformación de la amida II (estiramientos C-N-C y vibraciones de flexión N-H) característica de la quitina (López *et al.*, 2008), banda que no se da en las otras muestras por tener menos grupos GlcNAc. También, se puede observar un doblete a 1660 y 1630 cm⁻¹ atribuido al estiramiento C-O del grupo acetilo (Singh *et al.*, 2009).

En comparación con la muestra C54, en las muestras C62, C69, C77 y C84, se observaron diferencias en las señales entre 3000 y 2800 cm⁻¹; excepto en la banda 2875 cm⁻¹, las demás bandas disminuyeron ligeramente como resultado de la eliminación del metilo del grupo acetilo de la

unidad GlcNAc (Duarte *et al.*, 2002). Además, estas muestras mostraron una banda emergente a 1590 cm^{-1} (correspondiente a la vibración de flexión de las aminas) debido a la conversión de aminas secundarias en aminas primarias en el proceso de desacetilación. Por esta misma razón, la banda a 1560 cm^{-1} disminuyó al aumentar el DD del 62 al 78 %, mientras que en la muestra C84 no se observó esta banda debido a la desaparición de la mayoría de las aminas secundarias (Pawlak y Mucha, 2003).

Los espectros registrados a $290\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 5.6b) mostraron una disminución de la banda a 3450 cm^{-1} debido a la deshidratación de las muestras. Sin embargo, la disminución de las bandas a 1660 y 1560 cm^{-1} se produjo debido a la desacetilación que tiene lugar en la degradación del quitosano (Moussout *et al.*, 2016). Por otro lado, se pudo apreciar una banda a 1117 cm^{-1} en las muestras C54 y C62 debido al estiramiento del enlace C-O-C. Este cambio se produjo como resultado de las reacciones de despolimerización y a la división de los enlaces glicosídicos atribuibles al proceso de oxidación del quitosano (Moussout *et al.*, 2016; Hao *et al.*, 2017). A $340\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 5.6c) todas las bandas descritas para los espectros obtenidos a $290\text{ }^{\circ}\text{C}$ desaparecieron prácticamente para las muestras estudiadas. Tampoco se observó la señal a 2875 cm^{-1} por la degradación del anillo de piranosa (Zawadzki y Kaczmarek, 2010), aunque para la muestra C54 dicha disminución fue menor que para los otros quitosanos. Por último, los espectros a $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 5.6d) no mostraron diferencias relevantes entre muestras, lo que indica que los quitosanos formaron un residuo compuesto de estructuras carbonosas a esta temperatura (Gomez-Serrano *et al.*, 1996).

El análisis FTIR a diferentes temperaturas sugirió que el quitosano con el DD más bajo (C54) era el más estable térmicamente, ya que los cambios estructurales a los que se vio expuesto cambiaron menos bruscamente con el aumento de la temperatura.

5.3.3.2. Estabilidad térmica

Las etapas de degradación, así como las estabilidades térmicas de los quitosanos, fueron determinadas mediante termogravimetría. En la Figura 5.7 se muestran las curvas TGA y DTG de los quitosanos C54 y C84 ensayadas a una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$; el resto de las curvas, similares a la de la muestra C84, se recogen en el Anexo II (Publicación I). Para la muestra C54 se pueden observar cuatro etapas, cuyas velocidades máximas de degradación vienen dadas en la curva DTG mediante cuatro picos (Figura 5.7a). La primera etapa, entre 30 y $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, se atribuye a la desorción del agua (Corazzari *et al.*, 2015). El segundo y el tercer pico se encuentran superpuestos en el intervalo de 130 a $400\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta pérdida de peso se debe a la descomposición de las cadenas de los polímeros a través de la desacetilación de la molécula y a la escisión de los enlaces glucosídicos; en un primer momento se produce la degradación de las unidades Glc (130 - $310\text{ }^{\circ}\text{C}$) y, posteriormente, la descomposición de las unidades GlcNAc (310 - $400\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Nam *et al.*, 2010; Corazzari *et al.*, 2015; Moussout *et al.*, 2016). La última etapa de degradación se da entre 400 y $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se

atribuye a la descomposición total del anillo de piranosa y a la descomposición del carbono residual (Martínez-Camacho *et al.*, 2010; Moussout *et al.*, 2016).

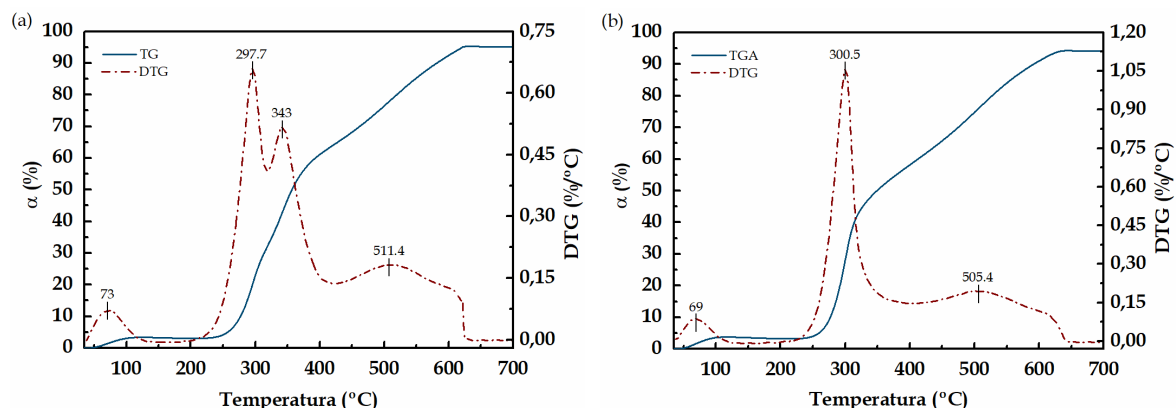


Figura 5.7. Curvas TGA y DTG medidas con una rampa de calefacción de 10 °C/min de los quitosanos (a) C54 y (b) C84

En el análisis termogravimétrico de la muestra C84 (Figura 5.7b) se observan solo tres etapas de degradación, de 30-130 °C, de 130-400 °C y de 400-600 °C, atribuidas a las mismas descomposiciones acontecidas en la muestra C54. Cabe destacar que, en este caso, al tener menos grupos GlcNAc en el polímero, en el tramo de 130-400 °C los picos correspondientes a las degradaciones de las unidades Glc y GlcNAc se encuentran superpuestos (apartado 4.3.1.2). El mismo hecho fue observado para las curvas correspondientes a las muestras C62, C69 y C77. Por lo tanto, comparando la muestra C54 con la muestra C84, se puede apreciar una influencia significativa del DD del quitosano en el proceso de degradación. En todas las muestras, el aumento de la rampa de calefacción provocó el desplazamiento de los picos de la curva DTG de las etapas a temperaturas más altas debido al retraso en la transferencia de calor (Moussout *et al.*, 2016).

En la Tabla 5.6 se recogen los resultados de las estabilidades térmicas de los quitosanos evaluadas al 25 % de pérdida de peso en base seca ($T_{25\%}$). Se decidió este porcentaje debido a que se corresponde con la segunda etapa del proceso de degradación y, por tanto, se tiene en cuenta el DD.

Tabla 5.6. Valores del $T_{25\%}$ a diferentes rampas de calentamiento para las muestras C54, C62, C69, C77 y C84

Muestra	$T_{25\%} \pm SD^*$				
	6 °C/min	8 °C/min	10 °C/min	12 °C/min	14 °C/min
C54	298,5 ± 1,8	304,2 ± 0,1	308,4 ± 0,6	311,2 ± 1,7	313,7 ± 0,8
C62	289,2 ± 1,0	294,7 ± 0,1	297,3 ± 0,3	300,4 ± 0,6	302,7 ± 0,4
C69	286,0 ± 0,1	290,6 ± 0,2	293,9 ± 0,7	297,2 ± 0,5	298,2 ± 1,0
C77	288,4 ± 1,0	291,7 ± 0,5	296,2 ± 0,2	299,4 ± 0,7	301,9 ± 0,5
C84	289,1 ± 1,1	295,3 ± 0,4	299,7 ± 0,2	303,5 ± 0,3	305,7 ± 0,2

* SD: desviación estándar

La muestra que presentó mayor estabilidad térmica fue el quitosano C54, ya que ofrece un $T_{25\%}$ entre 298,5 y 313,7 °C. Este resultado es acorde al obtenido mediante el estudio FTIR a diferentes temperaturas (apartado 5.3.3.1), ya que la muestra C54 presentó menos cambios estructurales que los otros quitosanos estudiados al aumentar la temperatura. Al aumentar el DD del quitosano, la estabilidad de las muestras C69-C84 se mantuvo constante. Este resultado está en concordancia con la cristalinidad de estos quitosanos, ya que ésta aporta una idea de la dificultad de degradación de las muestras (Wanjun *et al.*, 2005; Abdou *et al.*, 2008; Aranaz *et al.*, 2009). Para la muestra C62, pese a tener un índice de cristalinidad mayor, se obtuvieron valores similares a las otras muestras de estabilidad térmica, posiblemente debido al solapamiento de las degradaciones de los grupos Glc y GlcNAc en el termograma. Este comportamiento está de acuerdo con lo que observaron Nam *et al.* (2010) para quitosanos con un DD de 59, 76 y 85 %, cuyas estabilidades térmicas eran parecidas.

Tanto de los resultados de los análisis con FTIR como de los análisis mediante TGA, se puede concluir que la temperatura de formulación de los ionogeles y bionogeles de 100 °C no va a alterar la estructura química del quitosano.

5.3.4. Peso molecular promedio viscoso

El peso molecular es uno de los parámetros más importantes para establecer la naturaleza fisicoquímica del quitosano junto con el grado de desacetilación. En la Tabla 5.7 se recogen los valores de los parámetros K y n, de la viscosidad intrínseca (η) y de los pesos moleculares viscosos promedios (M_v) de los quitosanos obtenidos en función de su DD.

Tabla 5.7. Pesos moleculares viscosos promedios (M_v) y parámetros de la Ecuación 5.2 de las muestras de quitosano obtenidas en función de su DD

DD (%)	K	n	η (mL/mg)	$M_v \pm SD^*$ (g/mol)
54	$2,86 \cdot 10^{-6}$	1,27	135	$1,09 \cdot 10^6 \pm 2,19 \cdot 10^4$
62	$1,29 \cdot 10^{-5}$	1,21	243	$1,06 \cdot 10^6 \pm 2,11 \cdot 10^4$
69	$9,09 \cdot 10^{-5}$	1,12	422	$9,38 \cdot 10^6 \pm 1,88 \cdot 10^4$
77	$5,06 \cdot 10^{-4}$	1.02	707	$9,97 \cdot 10^5 \pm 1,99 \cdot 10^4$
84	$1,45 \cdot 10^{-3}$	0,96	619	$7,10 \cdot 10^5 \pm 1,42 \cdot 10^4$

* SD: desviación estándar

Al aumentar el DD, se incrementa la viscosidad intrínseca del quitosano. Esto se debe a que el disolvente empleado para llevar a cabo el ensayo sólo disuelve la proporción desacetilada del quitosano. Por ello, al aumentar el DD hay una mayor cantidad de polímero disuelto y la viscosidad de la mezcla se acrecienta. Por otro lado, los valores de los M_v obtenidos para todas las muestras presentan un orden de magnitud similar, en torno a 10^6 g/mol. Por ello, en el estudio de las propiedades obtenidas posteriormente para los ionogeles y bionogeles formulados, sólo se va a considerar la contribución del DD.

Los valores de los M_v obtenidos son acordes a los intervalos encontrados por otros autores para quitosanos comerciales con un DD entre 40-100 % con M_w de $0,6 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$ g/mol (Kumar, 2000; Brugnerotto *et al.*, 2001a), o con un DD de 78-98 % con M_v $5 \cdot 10^5 - 7 \cdot 10^5$ g/mol (Zhang y Neau, 2001). También, los resultados obtenidos concuerdan con los establecidos para quitosanos procedentes del exoesqueleto de gambas con un DD de 90 %, cuyo M_v fue de $4 \cdot 10^5$ g/mol, y con el de quitosanos procedentes del exoesqueleto de cangrejos (DD entre 83 y 85 %), cuyo M_v fue de $\sim 5 \cdot 10^5$ g/mol (Huei y Hwa, 1996; Yen *et al.*, 2009).



Capítulo 6
**Ionogel de celulosa convencional
reforzado con quitosano**

6. Ionogel celulosicos convencionales reforzados con quitosano

En este capítulo se recoge la formulación y la caracterización reológica y térmica de los ionogel convencionales con una matriz de cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio y celulosa reforzados con quitosano con diferentes grados de desacetilación. Primero, se describirá la parte experimental llevada a cabo, que abarca el planteamiento experimental y los materiales utilizados, así como el procedimiento experimental para la formulación y caracterización de estos ionogel. Posteriormente, se discutirán los resultados obtenidos para, por último, seleccionar el ionogel que mejores propiedades presente.

6.1. Planteamiento experimental y materiales

En la Figura 6.1 se muestra el planteamiento experimental utilizado para la formulación de los ionogel celulosicos convencionales. En primer lugar, se han formulado diferentes ionogel con la misma matriz del líquido iónico cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio (BmimCl) y celulosa, reforzados, cada uno, con un quitosano con diferente DD y con la misma carga para todos ellos. En segundo lugar, se llevó a cabo la caracterización de los ionogel reforzados formulados. Para ello, se estudiaron los comportamientos reológico y térmico de dichos materiales para obtener las propiedades reológicas y las temperaturas de transición vítrea (T_g) y de fusión (T_i) en función del DD del refuerzo.

Los materiales para llevar a cabo la formulación de los ionogel fueron el líquido iónico BmimCl, con una pureza del 99 % y adquirido a Iolitec GmbH, la celulosa microcristalina Avicel® suministrada por Sigma-Aldrich con un grado de polimerización de 230 y los quitosanos obtenidos en el Capítulo 5 de la presente tesis doctoral.

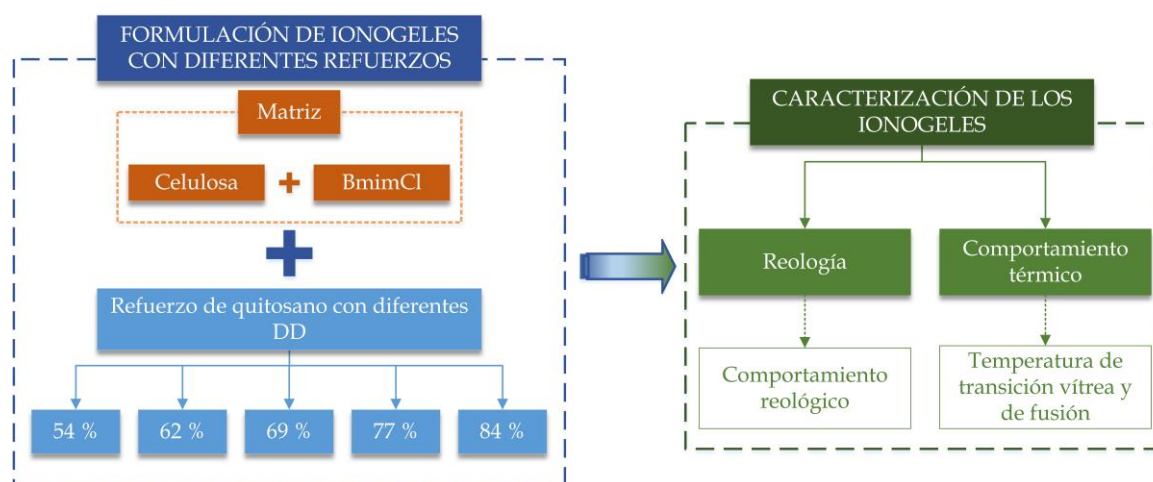


Figura 6.1. Planteamiento experimental de la formulación de ionogel convencionales reforzados con quitosano

6.2. Procedimiento para la formulación y caracterización de los ionogel convencionales reforzados con quitosano

En este apartado se describe el procedimiento experimental realizado para la formulación de los ionogel convencionales reforzados con quitosano y su caracterización reológica y térmica.

6.2.1. Formulación de los ionogel

La formulación de los ionogel convencionales reforzados con quitosano con diferentes DD se llevó a cabo en tres etapas. En primer lugar, se realizó una etapa de acondicionamiento de las materias primas. En segundo lugar, se mezclaron las materias primas para la síntesis del gel y, finalmente, esta mezcla se llevó a una etapa de gelificación. En la Figura 6.2 se muestra un esquema con las condiciones de operación de cada etapa. El procedimiento en detalle se recoge en la Publicación II (Anexo II).

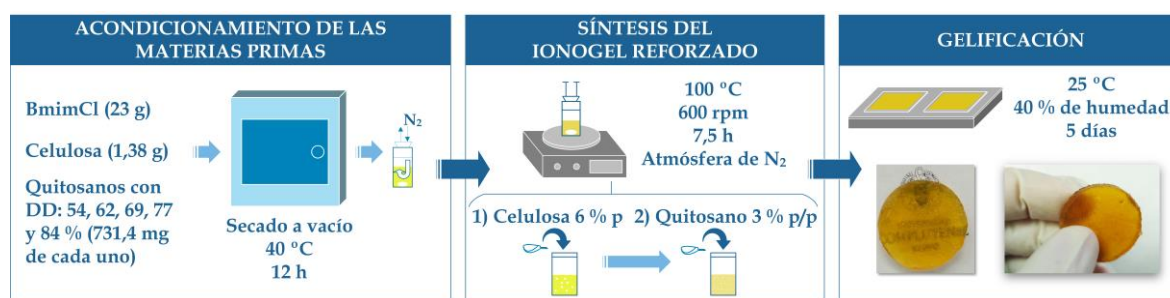


Figura 6.2. Esquema del proceso de formulación del ionogel convencional reforzado con quitosano con diferentes DD

Para referirse a los ionogel reforzados en función del DD del quitosano añadido, éstos se denominaron Gel54, Gel62, Gel69, Gel77 y Gel84 para los ionogel reforzados con un quitosano con un DD del 54, 62, 69, 77 y 84 %, respectivamente.

6.2.2. Caracterización de los ionogel

Los ionogel celulosicos reforzados con quitosano se caracterizaron mediante reología y análisis térmico. A continuación, se expone el procedimiento seguido para dicha caracterización.

6.2.2.1. Reología

La caracterización reológica se llevó a cabo en un reómetro de la marca TA Instruments (ARES), realizando tres tipos de ensayos dinámicos oscilatorios: barridos de tiempo, barridos de deformación y barridos de frecuencia. Los barridos de tiempo se hicieron con el objetivo de determinar la estabilidad de los gels durante el tiempo de medición. Por otra parte, los barridos de deformación se ejecutaron con el fin de determinar la región lineal viscoelástica (RLV) de los ionogel reforzados y establecer un valor de deformación dentro de esta región para los posteriores ensayos. El límite de la RLV (γ_c) se determinó como la deformación a partir de la cual la variación de G' era superior a un 5 % del valor medio. El procedimiento para este cálculo fue el siguiente: en primer lugar, se obtuvo el valor de referencia del módulo elástico como el valor medio de los módulos dentro de un intervalo de confianza del 95 %; en segundo lugar, se determinó el γ_c como aquel que arroja una desviación del 5 % con respecto al valor de referencia antes citado. Por último, los barridos de frecuencia se llevaron a cabo para obtener los espectros reológicos de los ionogel y poder, así, evaluar sus comportamientos viscoelásticos. En la Tabla 6.1. se recogen los valores utilizados en los ensayos descritos. En la Publicación II (Anexo II) se detallan las condiciones y modo de operación de ensayos.

Tabla 6.1. Condiciones de los ensayos reológicos para caracterizar los ionogel celulosicos convencionales reforzados con quitosano

Tipo de ensayo	γ (%)	ω (Hz)	t (min)	T (°C)
Tiempo	0,1	1	20	25
Deformación	0,1-10	50	-	25
Frecuencia	0,5	0,01-50	-	25

Para seleccionar la deformación empleada en los ensayos de frecuencia se utilizaron los resultados alcanzados de la RLV, siendo la deformación utilizada un valor dentro de esta región.

6.2.2.2. Análisis térmico

El análisis térmico se realizó con el objetivo de identificar las transiciones térmicas más importantes de los ionogel reforzados, es decir, se determinaron las temperaturas de transición vítrea (T_g) y la temperatura de fusión (T_f). De esta forma, se puede conocer la temperatura máxima de aplicación de estos materiales en la que no cambien sus propiedades. Para ello, se utilizó un

calorímetro de barrido diferencial (DSC) Mettler Toledo DSC 821^e, cuyas condiciones de operación se especifican en la Publicación II del Anexo II.

6.3. Resultados y discusión de la caracterización de los ionogel formulados

A continuación, se exponen los resultados obtenidos de la caracterización de los diferentes ionogel celulosicos reforzados. La discusión de dichos resultados se realizó solo en función del DD del quitosano utilizado como refuerzo, ya que los pesos moleculares promedios del refuerzo son similares, como se indicó en el apartado 5.3.4.

6.3.1. Comportamiento viscoelástico

El comportamiento viscoelástico de los ionogel celulosicos reforzados se determinó mediante estudios reológicos de tiempo, de deformación y de frecuencia, cuyos resultados se exponen en este apartado.

6.3.1.1. Estabilidad frente al tiempo y región lineal viscoelástica

Como se muestra en el material suplementario de la Publicación II (Anexo II), para todos los ionogel formulados, tanto el módulo complejo (G^*) como la viscosidad compleja (η^*), permanecieron constantes con el tiempo. Por tanto, las muestras analizadas fueron estables durante el tiempo de medida. Por otra parte, se estableció el límite de la RLV (γ_c) de los ionogel formulados mediante barridos de deformación. En la Tabla 6.2 se recogen los valores de γ_c para cada ionogel.

Tabla 6.2. Valores de γ_c de los ionogel celulosicos reforzados formulados

Ionogel	γ_c (%)
Gel54	1,12
Gel62	1,12
Gel69	1,77
Gel77	1,77
Gel84	1,77

Los ionogel Gel54 y Gel62 mostraron valores similares del γ_c al igual que las muestras Gel69, Gel77 y Gel84, aunque estas últimas presentaron un γ_c superior al de las muestras Gel54 y Gel62. Esto indica que las muestras Gel69, Gel77 y Gel84 tienen la capacidad de asumir una deformación superior a las del Gel54 y Gel62 sin modificar la estructura interna del material. En todos los casos, la deformación aplicada en los ensayos de frecuencia se estableció dentro de la RLV.

6.3.1.2. Espectro reológico

En la Figura 6.3 se muestran los espectros reológicos de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') obtenidos para cada ionogel celulosico reforzado.

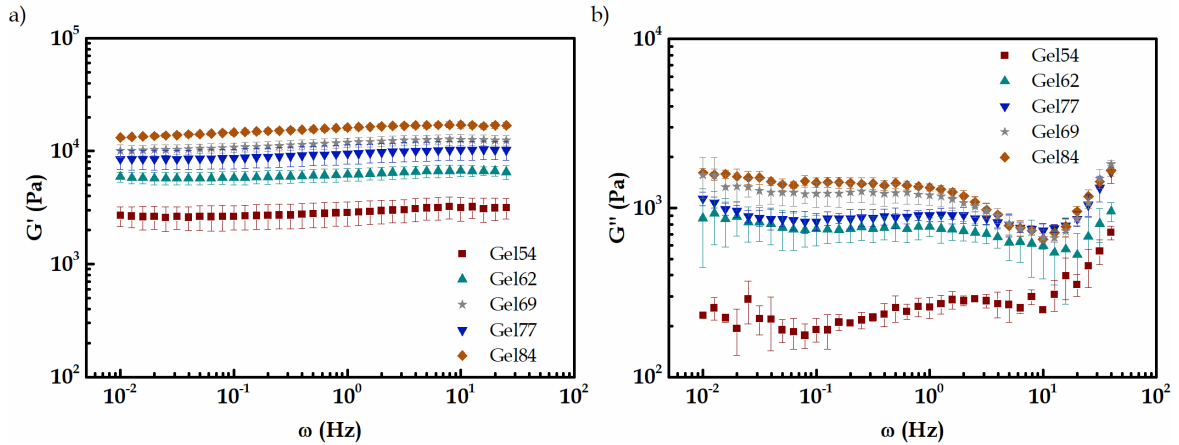


Figura 6.3. Espectros reológicos de los ionogel reforzados. (a) Modulo elástico (G') y (b) módulo viscoso (G'')

Los espectros obtenidos de los ionogel reforzados se encontraron dentro de la región de *plateau*, ya que el comportamiento predominante fue el elástico ($G' > G''$) y, además, G' permaneció constante a lo largo del ensayo. Estos espectros también mostraron una influencia importante del DD del refuerzo en las propiedades reológicas. A medida que aumentó el DD, los módulos G' se incrementaron para un valor fijo de frecuencia, como consecuencia de mayores interacciones en el ionogel. Las muestras Gel69 y Gel77 mostraron valores similares de sus módulos elásticos. El Gel84 presentó el mayor valor de G' ($\sim 10,6$ kPa); por ejemplo, para una frecuencia de 1 Hz, el valor medio de G' para el Gel84 fue 5,6 veces mayor que el del material Gel54 (2,8 kPa), que es el que menor valor presenta. En cuanto al módulo G'' , al incrementar el DD también aumentó su valor para una frecuencia determinada. Así, el Gel84 mostró los mayores valores de G'' , siendo 5,1 veces mayor que el G'' del Gel54 (0,26 kPa) a $\omega = 1$ Hz. Sin embargo, a frecuencias entre 1 y 50 Hz, los G'' de todos los ionogel formulados tendieron a solaparse (aproximadamente a 15 Hz), es decir, presentaban un comportamiento viscoso similar. A frecuencias superiores a 15 Hz, los valores de G'' aumentaron en todos los casos, indicando que el espectro se encontraba cerca de la región de transición vítrea.

Para evaluar la influencia del DD numéricamente, se ajustaron los valores del G' al modelo potencial indicado mediante la Ecuación 6.1:

$$G' = G_0 \cdot \omega^a \quad [6.1]$$

donde G_0 (Pa) es la fuerza del gel, es decir, la medida de la energía elástica almacenada en una unidad de volumen de la red del gel (Ranjan *et al.*, 2017); y " a " es un parámetro relacionado con la estructura interna del material. Si " a " toma el valor de cero, el ionogel está formado por interacciones químicas

o covalentes. Por otro lado, si “a” es mayor que cero, las interacciones físicas son las responsables de mantener la estructura de tipo gel (Ranjan *et al.*, 2017; Irani *et al.*, 2019). En la Tabla 6.3 se recogen los valores obtenidos mediante este ajuste del módulo elástico y la relación G'/G'' media del espectro de cada ionogel.

Tabla 6.3. Valores de los parámetros del ajuste potencial del módulo elástico y relación G'/G'' media de los espectros de los ionogel formulados

Ionogel	$G_0 \pm SD^*$ (Pa)	$a \pm SD^*$	R^2	$G'/G'' \pm SD^*$
Gel54	2887 ± 1	0,027 ± 0,002	0,869	10,8 ± 2,3
Gel62	6249 ± 1	0,022 ± 0,001	0,892	8,41 ± 1,6
Gel69	11730 ± 1	0,034 ± 0,001	0,959	10,4 ± 3,5
Gel77	9490 ± 1	0,030 ± 0,001	0,966	10,6 ± 1,5
Gel84	15831 ± 1	0,037 ± 0,001	0,967	12,8 ± 5,1

* SD: desviación estándar

La fuerza de los ionogel mejoró cuando se aumentó el DD del quitosano utilizado como refuerzo, excepto para el ionogel Gel69, cuya fuerza fue ligeramente superior a la del Gel77. Este hecho, junto con los espectros reológicos, indica que para los DD de los quitosanos entre 69 y 77 % no hay efectos significativos sobre las propiedades reológicas de los ionogel. El Gel84 presentó un valor de fuerza de gel significativo (81 % mayor que el valor del Gel54), es decir, una estructura interna con una mayor interacción entre la matriz y el refuerzo. El valor del parámetro “a” fue mayor que cero, pero muy cercano a éste (~0,02 y ~0,03), lo cual significa que los componentes de los ionogel formulados se encontraban unidos mediante interacciones físicas ($a > 0$), formando una red fuerte (“a” muy cercano a 0). Esto fue corroborado por el valor de la relación G'/G'' , ya que ésta se encontraba en torno a 10 (Prasad *et al.*, 2009). Por tanto, los ionogel reforzados se clasificaron como ionogel celulósicos físicos fuertes.

Se encontraron valores similares a los módulos obtenidos (G' : 2,5-10,6 kPa y G'' : 0,15-1,7 kPa) para otros gels utilizados en aplicaciones médicas/farmacológicas como dispositivos para el tratamiento de heridas. Así, Quah *et al.* (2018) desarrollaron un hidrogel de alginato utilizado como apósito de heridas con valores de G' ~8 kPa y G'' entre 0,12 y 1 kPa. Wang *et al.* (2017b) formularon hidrogeles con un 20 % de queratina con G' ~5 kPa y G'' entre 1 y 1,1 kPa para la cicatrización de heridas. Asimismo, Chen *et al.* (2017) elaboraron un apósito de hidrogel-composite con valores de G' de 4-11 kPa y G'' entre 0,6 y 1 kPa para una composición de microesferas de gelatina de 40 mg/mL. Además, los ionogel físicos formulados por Trivedi *et al.* (2014) y Sharma *et al.* (2015b) con agarosa-quitosano y agar, respectivamente, mostraron un comportamiento sólido similar al de los ionogel formulados en este estudio.

Los ionogel convencionales reforzados también mostraron una fuerte dependencia de la viscosidad compleja con la frecuencia al modificar el DD del refuerzo, como se puede observar en la Figura 6.4.

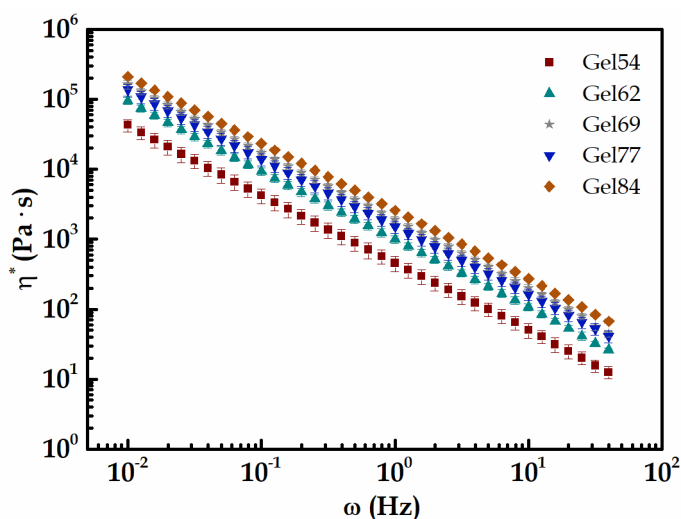


Figura 6.4. Viscosidad compleja (η^*) de los ionogel convencionales reforzados

Todos los ionogel mostraron un comportamiento pseudoplástico, es decir, al aumentar la frecuencia del ensayo, la viscosidad compleja disminuyó. De nuevo, el Gel84 fue el ionogel con mayores valores de la viscosidad compleja, y, por tanto, mayor consistencia frente a la deformación en el intervalo de frecuencias estudiado.

6.3.1.3. Mecanismo de formación del ionogel reforzado

A partir de los resultados reológicos obtenidos y de la teoría de la formación del ionogel celulósico (apartado 2.2.3), se planteó un mecanismo de formación del ionogel reforzado, cuyo esquema se muestra en la Figura 6.5. La matriz del ionogel está formada por puentes de hidrógeno entre la celulosa y el líquido iónico BmimCl. A medida que se incrementa el DD del refuerzo para la formulación del ionogel, se propiciaron más interacciones con la matriz; por ello, las propiedades reológicas mejoraron. Este comportamiento es posible debido a que las partículas de quitosano tienden a restringir el movimiento de la matriz ante deformaciones en la vecindad de cada partícula debido a los puentes de hidrógeno formados (Li y Zhu, 2018), en este caso entre la celulosa y el quitosano. Cuanto mayor es el DD del quitosano, mejor es la disponibilidad para crear estos puentes de hidrógeno en el ionogel.

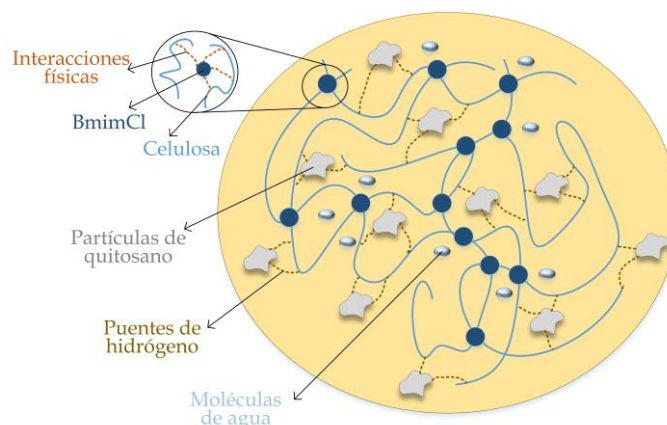


Figura 6.5. Esquema del proceso de formación del ionogel celulósico convencional reforzado con quitosano

En el material suplementario de la Publicación II (Anexo II) se pueden encontrar los resultados de dos ensayos que demostraron que las interacciones en los ionogel reforzados son de tipo físico (por puentes de hidrógeno). El primero de ellos fue un ensayo de termorreversibilidad, en el cual se observó que tras fundir el ionogel y dejarlo de nuevo gelificar, éste vuelve a tener una estructura tipo gel. En el segundo ensayo, se formó el hidrogel a partir del ionogel con la sustitución física del BmimCl por agua, un disolvente más polar (Markstedt *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018).

6.3.2. Comportamiento térmico

El comienzo de la región de transición vítrea para todos los ionogel formulados se dio a, aproximadamente, 109 °C, y la temperatura de fusión (T_f) fue de 40 °C (Figura 6.6).

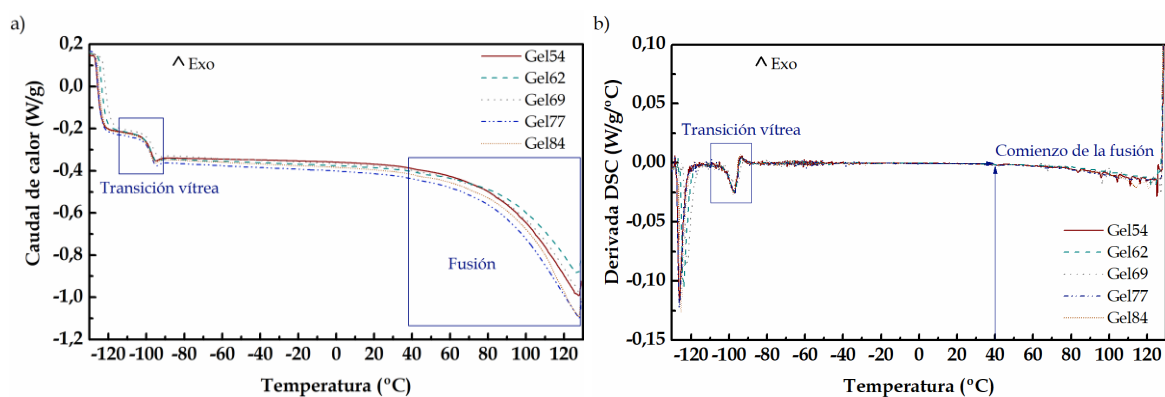


Figura 6.6. (a) Termogramas DSC y (b) curvas derivadas de DSC de los ionogel celulósicos reforzados formulados

Las temperaturas de transición vítrea (T_g) de las muestras Gel54, Gel62, Gel69, Gel77 y Gel84 fueron $-98,9 \pm 0,5$; $-98,3 \pm 0,1$; $-97,9 \pm 0,8$; $-98,5 \pm 0,4$ y $-98,6 \pm 0,3$ °C, respectivamente. No se observó una diferencia significativa en las T_g de los ionogel formulados, por lo que los materiales de refuerzo no influyeron en las propiedades térmicas de estos ionogel. El BmimCl y el quitosano

tienen temperaturas de transición vítrea de $\sim (-69)^\circ\text{C}$ (Fredlake *et al.*, 2004) y $\sim 150^\circ\text{C}$ (Dong *et al.*, 2004), respectivamente. Los valores de T_g obtenidos fueron inferiores a los del BmimCl (materia prima en más proporción en el ionogel). Esto podría atribuirse al agua absorbida por los ionogelatos durante la fase de gelificación en la formulación de los ionogelatos, ya que si los ionogelatos absorben un 9 % (molar) de agua, la T_g podría reducirse hasta los 48°C (Sippel *et al.*, 2016).

Cabe destacar que, para la utilización de estos materiales, las temperaturas máximas de uso de los ionogelatos reforzados no podrían superar los 40°C . Este hecho puede suponer una ventaja con vistas a su utilización en técnicas de impresión 3D para moldear los ionogelatos, pues la T_f es baja, 40°C frente a 180°C para el PLA, componente básico de la tinta estándar para la impresión 3D (Grémare *et al.*, 2018), y, además, los ionogelatos presentan termorreversibilidad. Asimismo, las propiedades reológicas obtenidas en este estudio están dentro de los valores encontrados para las estructuras tipo gel obtenidas por impresión 3D: G' entre 5 y $10,5\text{ kPa}$ y G'' de $0,2-3,5\text{ kPa}$ (Diañez *et al.*, 2019).

6.3.3. Selección del DD del quitosano para el refuerzo de ionogelatos celulósicos

Para la selección del DD del refuerzo se tuvo solo en cuenta el estudio de las propiedades reológicas, debido a que el DD de los quitosanos apenas afectó al comportamiento térmico de los ionogelatos formulados. En la Figura 6.6 se muestra un resumen de las propiedades reológicas obtenidas más relevantes (G' , G'' y G_0); en el caso de los módulos G' y G'' se ha elegido una frecuencia de 1 Hz para poder comparar los ionogelatos.

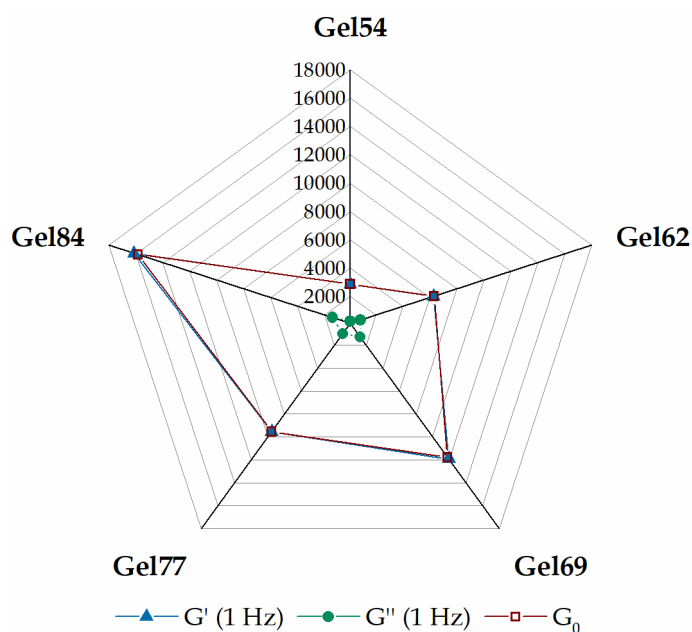


Figura 6.7. Valores de los módulos elástico y viscoso, y la fuerza de gel, en Pa, de los ionogelatos celulósicos reforzados

Como se puede observar en la Figura 6.7, el módulo elástico en comparación con el módulo viscoso es mucho más significativo para los ionogeles formulados, de ahí su comportamiento predominante elástico. Por este motivo, se va a seleccionar el ionogel con mejor comportamiento elástico y fuerza de gel, ya que las interacciones entre la matriz y el refuerzo son mayores y, por ello, puede soportar mayores deformaciones durante su uso sin perder su forma original. El ionogel Gel84 es el que cumple dichos requisitos, por tanto, el DD del quitosano seleccionado para reforzar ionogeles es de 84 %.



Capítulo 7
Bionogeles celulósicos reforzados con
quitosano

7. Bionogel celulosicos reforzados con quitosano

En este capítulo se describe el planteamiento experimental llevado a cabo y los materiales utilizados para la formulación de los bionogel sin reforzar y reforzados con quitosano. En segundo lugar, se recoge el procedimiento experimental utilizado para la obtención de dichos gels. Posteriormente, se presentan los resultados y discusión de la caracterización reológica de los bionogel sin reforzar para seleccionar la concentración de celulosa que mejores propiedades otorgue a los mismos. A continuación, se exponen y discuten los resultados de la caracterización reológica y antimicrobiana de los bionogel celulosicos reforzados con quitosano para, por último, seleccionar la carga de refuerzo que ofrezca las mejores propiedades de dichos bionogel.

7.1. Planteamiento experimental y materiales

En la Figura 7.1 se muestra el planteamiento experimental llevado a cabo para la formulación y caracterización de los bionogel celulosicos con y sin refuerzo de quitosano. En primer lugar, se ha llevado a cabo la formulación y caracterización de los bionogel sin reforzar. Para tal fin, se ha realizado un *screening* de líquidos iónicos de aminoácido y colina (ChAAIL) para seleccionar aquel o aquellos que disolvieran la celulosa y se produjera, junto con la celulosa, la gelificación del bionogel. Posteriormente, se formuló el bionogel celulosico con diferentes concentraciones de celulosa (0,5; 1; 1,5 y 2 %) y se caracterizó mediante reología y espectroscopía infrarroja. A partir de los resultados reológicos obtenidos, se seleccionó aquel bionogel celulosico que presentó mejores propiedades reológicas.

En segundo lugar, se procedió a formular los bionogel celulosicos reforzados con quitosano con un DD del 84 % en diferentes cargas del 0,25; 0,5; 0,75 y 1 % p/p, cuya matriz fue el

bionogel con la concentración de celulosa seleccionada en la primera etapa. Para corroborar que el DD influye en las propiedades viscoelásticas de los ionogel y bionogel, se ha formulado un bionogel reforzado con un quitosano con un DD de 54 % al 1 % p/p. Posteriormente, se caracterizaron estos bionogel reforzados mediante reología y análisis antimicrobiano. Esta última evaluación es necesaria para su posible aplicación dentro del sector médico/farmacológico.

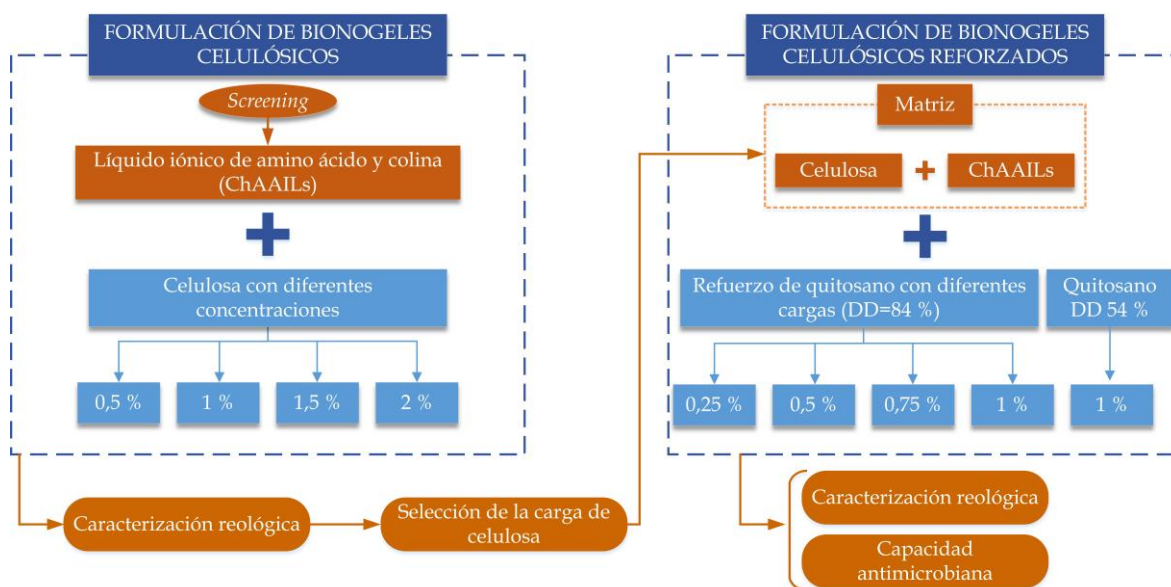


Figura 7.1. Planteamiento experimental para la formulación y caracterización de bionogel celulosicos con y sin refuerzo de quitosano

Los materiales necesarios para llevar a cabo la experimentación fueron: los líquidos iónicos de aminoácido y colina que se recogen en la Tabla 7.1, suministrados por Iolitec GmbH; la celulosa microcristalina descrita en el apartado 6.1; y los quitosanos obtenidos en el Capítulo 5 con un DD entre el 54 y el 84 %.

Tabla 7.1. ChAAIL utilizados en el *screening* para la selección del líquido iónico de base biológica

Líquido iónico	Nomenclatura	Pureza (%)	Característica del aminoácido
Lisinato de colina	ChLys	>90	Cadenas laterales cargadas eléctricamente
Serinato de colina	ChSer	>95	Cadenas laterales polares
Isolucinato de colina	ChIsol	>95	Cadenas laterales apolares
Arginato de colina	ChArg	>95	Cadenas laterales cargadas eléctricamente

En el Anexo I de la presente tesis doctoral se incluyen las estructuras químicas de los líquidos iónicos utilizados en esta experimentación para la selección del líquido iónico de base biológica.

7.2. Procedimiento para la formulación de los bionogel celulosicos

En este apartado se describen los procedimientos llevados a cabo para el *screening* de los líquidos iónicos de aminoácidos y colina para la formulación de los bionogel celulosicos con y sin refuerzo de quitosano. También, se incluyen los procedimientos del estudio reológico y del análisis de la capacidad antimicrobiana de los bionogel reforzados y de su matriz (el bionogel celulosico sin reforzar).

7.2.1. Procedimiento para el "screening" de líquidos iónicos de aminoácido y colina

El *screening* de los líquidos iónicos de base biológica se realizó añadiendo a éstos un 1 % en peso de celulosa y esperando un tiempo máximo de 6 h para comprobar si ésta se disolvía en el líquido iónico. Posteriormente, se procedió a la gelificación de la mezcla a temperatura ambiente dejando transcurrir el tiempo preciso. El tiempo de disolución máximo se fijó en 6 h debido a que es el tiempo de disolución completa de la celulosa en el líquido iónico convencional BmimCl para una concentración de 6 % en peso.

Primero, se precalentaron los líquidos iónicos a una temperatura de 100 °C durante 10 min. Después, se añadió la celulosa a cada líquido iónico con una agitación de 400 rpm en atmósfera inerte, manteniendo la temperatura en 100 °C, y la disolución se monitorizó tomando muestra cada hora y observándola en el microscopio óptico Zeiss Axio Scope.A1. La disolución se completó cuando no se observaron partículas de celulosa en el microscopio. Una vez disuelta la celulosa o superadas las 6 h, las mezclas se depositaron a temperatura ambiente en el molde de acero para su gelificación, al igual que como se describió para los ionogel (Capítulo 6) a temperatura ambiente para comprobar su gelificación. También, para cerciorarse de que la disolución se había producido, los bionogel obtenidos se cortaron y se lavaron con agua para comprobar si se formaba el hidrogel, es decir, si la celulosa precipitaba en forma de red tridimensional.

7.2.2. Formulación de los bionogel celulosicos sin refuerzo de quitosano

La formulación de los bionogel celulosicos con diferentes concentraciones de celulosa se llevó a cabo mediante un procedimiento similar a la formulación de la matriz de los ionogel celulosicos convencionales (apartado 6.2.1). En la Figura 7.2 se muestra un esquema de la formulación de estos bionogel. Los tiempos de disolución de la celulosa en el líquido iónico seleccionado en el *screening* fueron de 3, 4, 4,5 y 6,5 h para las concentraciones del 0,5; 1; 1,5 y 2 %, respectivamente. Cabe destacar que no se pudo introducir una concentración superior al 2 % de celulosa debido a que no se disolvía completamente y, además, se degradaba la mezcla cambiando bruscamente de color (de color caramelo rojizo a negro) cuando el tiempo de disolución superaba

las 6 h. En la Publicación III (Anexo II) se encuentra el procedimiento de la formulación de los bionogelatos celulósicos, así como las condiciones empleadas para tal fin.

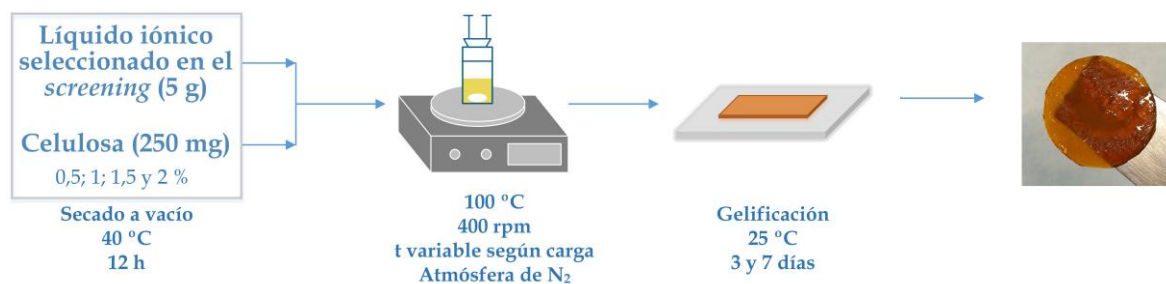


Figura 7.2. Esquema del proceso de formulación de los bionogelatos celulósicos

Las propiedades reológicas de los bionogelatos formulados se midieron a los 3 y 7 días después de la mezcla (en adelante días de postgelificación). A los bionogelatos celulósicos se les identificó según la concentración de celulosa como BC0,5; BC1; BC1,5 y BC2 para las concentraciones del 0,5; 1; 1,5 y 2 %, respectivamente.

7.2.3. Formulación de los bionogelatos celulósicos con refuerzo de quitosano

La formulación de los bionogelatos celulósicos reforzados con quitosano se llevó a cabo en las mismas etapas descritas en el apartado 6.2.1. Dichas etapas son el acondicionamiento de las materias primas, la mezcla de ellas y su gelificación, como se muestra en la Figura 7.3. En este caso, el porcentaje de celulosa que formó la matriz es el elegido de entre los bionogelatos celulósicos formulados sin quitosano.

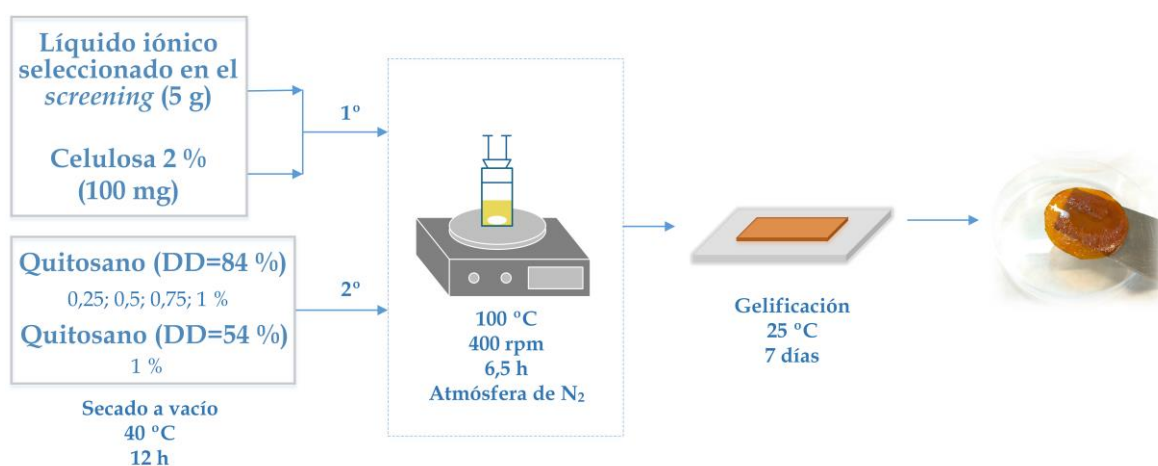


Figura 7.3. Esquema del proceso de formulación de los bionogelatos celulósicos reforzados con quitosano

Una vez conformada la matriz de celulosa y el líquido iónico seleccionado en el *screening*, se añadió el quitosano con diferentes cargas en una sola dosificación: 0,25; 0,5; 0,75 y 1 % p/p para el quitosano con un DD del 84 %, y un 1 % p/p para el quitosano con un DD del 54 %. Cargas superiores al 1 % no se emplearon debido a la alta viscosidad que presentaban las mezclas líquido iónico del *screening*/celulosa/quitosano, lo que imposibilitaba la agitación de la mezcla. Posteriormente, la mezcla para cada carga de quitosano se llevó a gelificación a 25 °C durante 7 días en el molde de acero recubierto con PET descrito en el apartado 6.2.1.

Los bionogel reforzados fueron identificados según la carga de quitosano añadida y su DD. Así pues, los bionogel con un quitosano con un DD del 84 % y cargas del 0,25; 0,5; 0,75 y 1 %, se denominaron B0,25; B0,5; B0,75 y B1, respectivamente. Para el bionogel reforzado con un quitosano con un DD del 54 % al 1 % de carga de quitosano se le denominó BD54.

7.3. Caracterización de los bionogel celulosicos formulados

Los bionogel celulosicos, tanto sin refuerzo de quitosano como con él, fueron caracterizados mediante reología y análisis antimicrobiano. Además, el bionogel celulosico sin refuerzo fue caracterizado también por espectroscopía infrarroja. A continuación, se describen los procedimientos para dichas caracterizaciones.

7.3.1. Caracterización reológica

El procedimiento para la caracterización reológica de los bionogel fue similar al realizado para los ionogel celulosicos reforzados (apartado 6.2.2.1). Las diferencias entre estas caracterizaciones radican en las condiciones de los ensayos y en el espacio entre las geometrías. Este último fue de 2 mm para ambos bionogel con y sin refuerzo. En la Tabla 7.2 y en las Publicaciones III y IV (ambas en el Anexo II) se recogen las condiciones del ensayo para los bionogel sin refuerzo y con refuerzo de quitosano, respectivamente.

Tabla 7.2. Condiciones de los ensayos reológicos para caracterizar los bionogel celulosicos

Bionogel	Tipo de ensayo	γ (%)	ω (Hz)	t (min)	T (°C)
Sin refuerzo	Tiempo	0,01	1	30	25
	Deformación	0,007-0,3	50	-	25
	Frecuencia	0,01 (dentro RLV)	0,01-50	-	25
Con refuerzo	Tiempo	0,005	1	30	25
	Deformación	0,0003-0,5	50	-	25
	Frecuencia	0,005 (dentro RLV)	0,01-50	-	25

7.3.2. Espectroscopía infrarroja de reflectancia total atenuada con Transformada de Fourier

La espectroscopía infrarroja de reflectancia total atenuada con Transformada de Fourier (FTIR/ATR) se empleó para determinar el tipo de interacción entre la celulosa y el líquido iónico seleccionado en el *screening* de los bionogel celulosicos sin reforzar. En la Publicación III (Anexo II) se recogen las condiciones empleadas en este análisis.

7.3.3. Análisis antimicrobiano

Para evaluar la capacidad antimicrobiana de los bionogel celulosicos reforzados se utilizó el método de difusión en agar con ciertas modificaciones debido al estado físico de los bionogel. La capacidad antimicrobiana se estudió para dos bacterias: la *E. coli* (bacteria Gram-negativa) y la *S. aureus* (bacteria Gram-positiva), ambas suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo. Una vez elaborado el preinóculo con una población de bacterias entre 10^6 y 10^7 CFU/mL, se sembraron 0,1 mL de cada bacteria en placas Petri de agar. En estas placas se pusieron discos de celulosa esterilizados de 13 mm de diámetro (D_0) y, encima de éstas, se colocaron los bionogel reforzados previamente cortados con un diámetro de 5 mm (Figura 7.4). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h y, posteriormente, se midió el diámetro de inhibición alrededor del disco de celulosa. Dicho disco de celulosa fue esencial debido a la fusión y/o difusión parcial de los bionogel; por lo tanto, la zona de inhibición fue controlada mejor.

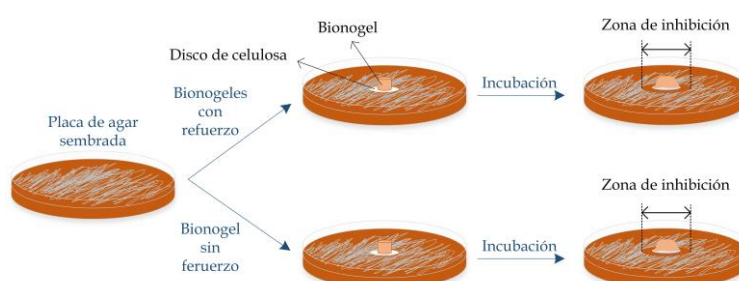


Figura 7.4. Esquema del proceso de análisis antimicrobiano de los bionogel

Se realizaron pruebas de control empleando el bionogel sin refuerzo de quitosano, es decir, la matriz de los bionogel reforzados. El bionogel sin quitosano fue colocado en la placa de agar sembrada sobre el disco de celulosa e incubado en las mismas condiciones que los bionogel reforzados con quitosano.

7.4. Bionogel celulosicos sin reforzar

En este apartado se exponen los resultados y la discusión del *screening* de líquidos iónicos de aminoácido y colina para la formulación de los bionogel celulosicos. Asimismo, se recogen los resultados y la discusión de la caracterización reológica tanto de los bionogel celulosicos sin

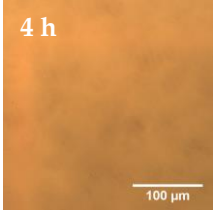

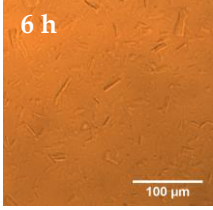

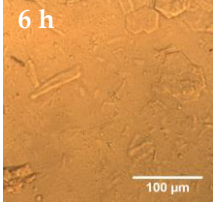

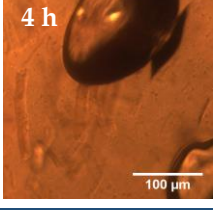

refuerzo de quitosano, como con refuerzo de quitosano. De la primera caracterización reológica, se seleccionará el porcentaje de celulosa para formar la matriz de los bionogeles celulósicos reforzados. Además de la caracterización reológica, también se exponen los resultados de los análisis antimicrobianos de los bionogeles reforzados y de su matriz. Finalmente, se seleccionará la carga de quitosano que mejores propiedades aporte al bionogel celulósico.

7.4.1. "Screening" de los líquidos iónicos de aminoácido y colina

En la Tabla 7.3 se recogen las observaciones del *screening* para cada líquido iónico de aminoácido y colina utilizado. A continuación, se describirán las observaciones más relevantes para cada ChAAIL utilizado durante el proceso de *screening*.

- **ChLys.** Este líquido iónico disolvió la celulosa en 4 h y el tiempo de gelificación completa del bionogel fue de 7 días. Se observó que la gelificación tenía lugar desde fuera hacia el centro de la mezcla en la placa de gelificación. Al lavar el bionogel formulado con agua, la celulosa precipitó en forma de red tridimensional definida, como se muestra en la fotografía de la Tabla 7.3. Este hecho indicó que la disolución de la celulosa fue completa y que ésta estaba bien distribuida en el bionogel.
- **ChSer.** El líquido iónico no disolvió suficientemente la celulosa en el tiempo máximo fijado como para que tuviese lugar la gelificación de la mezcla. Al lavar con agua, la celulosa precipitó sin formar ninguna red tridimensional.
- **ChIsol.** En el tiempo máximo fijado, el líquido iónico ChIsol no fue capaz de disolver la celulosa. Esta mezcla se dejó reposar para gelificar y se observó cómo se formaba una capa amarillenta opaca por encima del gel. Este hecho indicó que la gelificación del material se estaba dando desde la parte superior a la inferior del mismo. Sin embargo, transcurridos más de 7 días la parte inferior de la capa amarillenta no se gelificó. El material obtenido fue lavado con agua (9 días después), observándose la precipitación de la celulosa en forma de red tridimensional no definida. Por tanto, se puede concluir que, en efecto, la celulosa fue disuelta parcialmente en el ChIsol.
- **ChArg.** La mezcla de ChArg y celulosa durante el proceso de disolución formó burbujas rojizas que indicaban una posible degradación de la disolución. A las 4 horas del proceso de disolución se tuvo que apartar la mezcla debido a la alta viscosidad (ésta no permitía la agitación) y el exceso de burbujeo en el recipiente. Posteriormente, la mezcla se dejó reposar más de 9 días en la placa sin observarse su gelificación.

Tabla 7.3. Observaciones del *screening* de los líquidos iónicos de ChAAIL utilizados

Líquido iónico	Disolución de celulosa	Imágenes microscopio óptico	Tiempo de Gelificación	Fotografía del lavado con agua
ChLys	Completa a 4 h	 4 h 100 μ m	7 días	
ChSer	No disuelve a tiempo máximo de 6 h	 6 h 100 μ m	No gelifica	
ChIsol	No disuelve a tiempo máximo de 6 h	 6 h 100 μ m	Gelificación parcial 7 días	
ChArg	No disuelve, se tuvo que sacar a las 4 h por burbujeo	 4 h 100 μ m	No gelifica	

Los líquidos iónicos más prometedores para formar bionogeles, según el *screening* realizado, son el ChLys y el ChIsol. El ChIsol fue descartado debido a que la celulosa no se disolvió completamente en el tiempo máximo de 6 h y a que no se produjo una gelificación completa. Sin embargo, los resultados obtenidos para el ChLys sí fueron prometedores en cuanto a la disolución de la celulosa y la gelificación y, por ello, éste fue el ChAAIL elegido para la formulación de bionogeles en el presente trabajo.

7.4.2. Comportamiento viscoelástico y mecanismo de formación del bionogel celulósico

Los resultados de los ensayos dinámicos de tiempo para los 3 y 7 días de postgelificación mostraron que tanto el módulo G^* , así como la η^* permanecieron constantes con el tiempo para todas las concentraciones de celulosa utilizadas. Por ello, los bionogeles fueron estables durante el tiempo de medida de los posteriores ensayos. En la Tabla 7.4 se recogen los valores de los límites de la RLV que presentaron estos materiales para los días de postgelificación estudiados.

Tabla 7.4. Valores de γ_c de los bionogel celulosicos formulados

Bionogel	γ_c (%)	
	3 días de postgelificación	7 días de postgelificación
BC0,5	-	-
BC1	0,034	0,022
BC1,5	0,027	0,018
BC2	0,024	0,019

A los 3 días de postgelificación se observa cómo a medida que disminuye la concentración de celulosa aumenta el γ_c , hasta tal punto que, para la muestra BC0,5, este límite no fue observado. Sin embargo, a los 7 días de postgelificación no se observó una diferencia significativa entre los límites de la RLV para las muestras BC1, BC1,5 y BC2, siendo éstos similares entre sí. En cambio, para la muestra BC0,5, los resultados fueron similares a los obtenidos a 3 días de postgelificación. El hecho de que la muestra BC0,5 no muestre este límite, indica que es el bionogel con mayor deformabilidad, entendiendo la deformabilidad como la habilidad de aceptar deformaciones sin modificar su estructura interna. En consecuencia, este bionogel presenta una estructura de red débil en comparación con la de las otras muestras.

La diferencia de resultados obtenidos entre los días de postgelificación estudiados indica que a 3 días de postgelificación los bionogel formulados estaban evolucionando, es decir, las redes del gel no estaban constituidas completamente.

En la Figura 7.4 se muestran los espectros reológicos obtenidos mediante los ensayos dinámicos de frecuencia. Dichos espectros mostraron que los bionogel formulados, tanto a 3 como a 7 días de postgelificación, presentaban un comportamiento elástico predominante ($G' > G''$, zona de meseta gomosa). Específicamente, a los 3 días de postgelificación hubo una influencia significativa del contenido de celulosa, siendo el bionogel BC2 el que presentó los valores más altos de G' . Por ejemplo, para 4 Hz, los valores de los módulos G' fueron 1,5; 2,8; 7,7 y 30 kPa para las muestras BC0,5, BC1, BC0,5 y BC2, respectivamente. Por ello, el bionogel BC2 mostró un comportamiento más elástico. En cuanto al módulo G'' , la tendencia es similar al módulo G' , de nuevo mostrando el bionogel BC2 el comportamiento más viscoso ($\omega=4$ Hz, el módulo G'' fue de 0,6; 0,7; 1,2 y 4,6 kPa para las muestras BC0,5, BC1, BC0,5 y BC2, respectivamente). A los 7 días de postgelificación, a medida que se incrementó la concentración de celulosa los módulos G' y G'' aumentaron, excepto para las muestras BC1 y BC1,5 cuyos módulos fueron similares. Para una frecuencia de 4 Hz, los valores del módulo G' fueron 2, 18, 26 y 61 kPa para las muestras BC0,5, BC1, BC0,5 y BC2, respectivamente; mientras que los valores del módulo G'' fueron de 0,8; 3,2; 6,3 y 11 kPa, respectivamente. Estos resultados sugieren que las interacciones entre el ChLys y la celulosa aumentaron cuando la concentración de ésta fue mayor.

El tiempo de postgelificación influyó en las propiedades reológicas estudiadas. Así, a los 7 días de postgelificación todos los módulos fueron mayores en comparación con los obtenidos a los 3 días de postgelificación. Para el bionogel BC2, a los 3 días de postgelificación los valores de G' (4 Hz) y G'' (4 Hz) fueron un 51 y un 58 % inferiores, respectivamente, a los valores obtenidos para la misma muestra a los 7 días de postgelificación. Esto podría deberse a que las interacciones entre el ChLys y la celulosa se han incrementado debido a que el tiempo de contacto entre ellos es mayor.

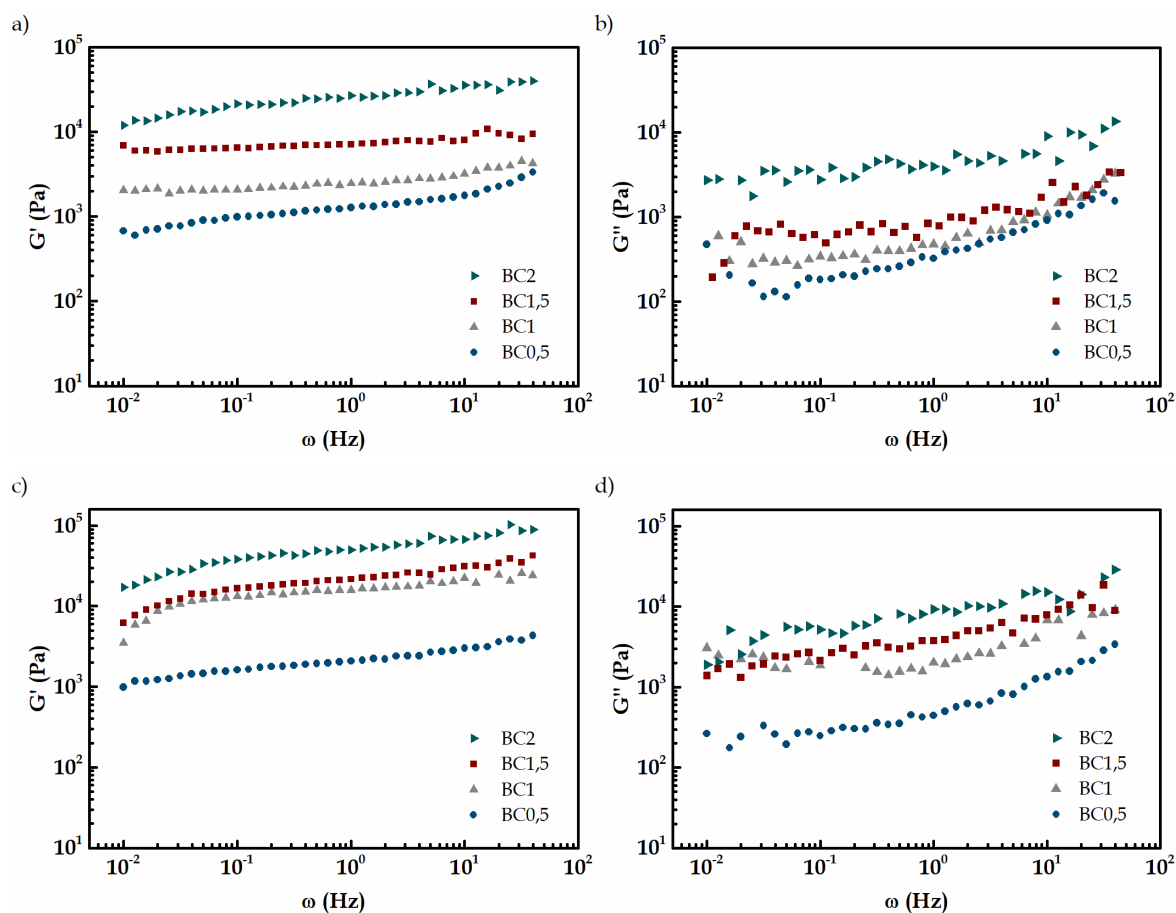


Figura 7.5. Espectros reológicos de los bionogelatos celulósicos formulados a 3 días (a y b) y a 7 días (b y c) de postgelificación

Los bionogelatos formulados presentan propiedades reológicas y espectros similares a los obtenidos por otros autores para hidrogelatos cuyo uso se centra en el sector médico/farmacéutico. Slavutsky y Bertuzzi (2019), Lee *et al.* (2019) y Quah *et al.* (2018) desarrollaron hidrogelatos que contienen pectina y goma brea, y ácido hialurónico y alginato, respectivamente, obteniendo espectros reológicos con formas similares a los alcanzados en este trabajo. Además, los módulos obtenidos por Quah *et al.* (2018), de entre 0,2 y 10 kPa y de 0,02 a 1 kPa para G' y G'' , respectivamente, fueron consistentes con los obtenidos en esta investigación (G' : 0,7-100 kPa, G'' : 0,1-20 kPa). Por ello, los bionogelatos celulósicos formulados pueden ser de uso potencial en este sector para obtener biomateriales funcionales.

Para evaluar la fuerza de gel (G_0) e identificar el tipo de interacciones entre el ChLys y la celulosa en el propio bionogel se ha aplicado a los datos de módulos G' obtenidos el modelo de la potencia (Ecuación 6.1). Los parámetros de este modelado se recogen en la Tabla 7.5, junto con la relación de G'/G'' para 4 Hz de frecuencia.

Tabla 7.5. Parámetros del ajuste potencial del módulo elástico y relación G'/G'' para 4 Hz de los espectros de los bionogel celulosicos formulados

Postgelificación	Bionogel	$a \pm SD^*$	$G_0 \pm SD^*$ (Pa)	R^2	G'/G'' (4 Hz)
3 días	BC2	$0,129 \pm 0,003$	25491 ± 1	0,961	6,5
	BC1,5	$0,060 \pm 0,003$	7450 ± 1	0,864	6,2
	BC1	$0,091 \pm 0,004$	2649 ± 1	0,863	4,0
	BC0,5	$0,157 \pm 0,004$	1336 ± 1	0,950	2,6
7 días	BC2	$0,167 \pm 0,005$	49805 ± 1	0,938	5,6
	BC1,5	$0,171 \pm 0,005$	21526 ± 1	0,934	4,1
	BC1	$0,144 \pm 0,008$	15536 ± 1	0,802	5,5
	BC0,5	$0,142 \pm 0,003$	2190 ± 1	0,966	2,9

* SD: desviación estándar

El valor del parámetro “a” es superior a cero, por tanto, los bionogel celulosicos, a los días de postgelificación estudiados, mantienen su estructura de red tridimensional mediante interacciones físicas entre el ChLys y la celulosa. En cuanto a la fuerza de los bionogel, ésta es mayor cuando la concentración de celulosa aumenta. Así, el bionogel con mayor fuerza es el BC2, exhibiendo hasta un 1808 y un 2174 % más que la del bionogel BC0,5 a los 3 y 7 días de postgelificación, respectivamente. Como se puede observar, a los 7 días de postgelificación, los bionogel muestran mayores fuerzas de gel que a 3 días (Tabla 7.5).

Para clasificar los bionogel obtenidos, se atendió a los valores de la relación G'/G'' a 4 Hz, mostrada en la Tabla 7.5. Según la relación G'/G'' a 4 Hz, los bionogel formulados pueden clasificarse como geles físicos débiles, debido a que estas relaciones oscilan entre 2,6 y 6,5 (<10) y a que los módulos dependen ligeramente de la frecuencia. Aunque el concepto de gel débil se ha aplicado a todos los bionogel formulados, hay diferentes niveles de “debilidad”, ya que el bionogel BC2 presentó relaciones de módulo mayores para los tiempos de postgelificación estudiados (3 días de postgelificación: $G'/G''=6,5$; 7 días de postgelificación: $G'/G''=5,6$), y, por tanto, fue el bionogel más fuerte. Por el contrario, el bionogel BC0,5 exhibió los valores más bajos de esta relación, siendo, por tanto, el gel más débil para los tiempos de postgelificación estudiados (3 días de postgelificación: $G'/G''=2,6$; 7 días de postgelificación: $G'/G''=2,9$).

En cuanto a la viscosidad compleja de los materiales formulados, se observaron las mismas tendencias que en los casos de los módulos y de la fuerza del gel, como se muestra en la Figura 7.6. Todos los bionogel formulados mostraron un comportamiento pseudoplástico, siendo el bionogel

BC2 el que presentó mayores valores de la viscosidad compleja y, por tanto, mayor consistencia frente a la deformación a los dos tiempos de postgelificación estudiados.

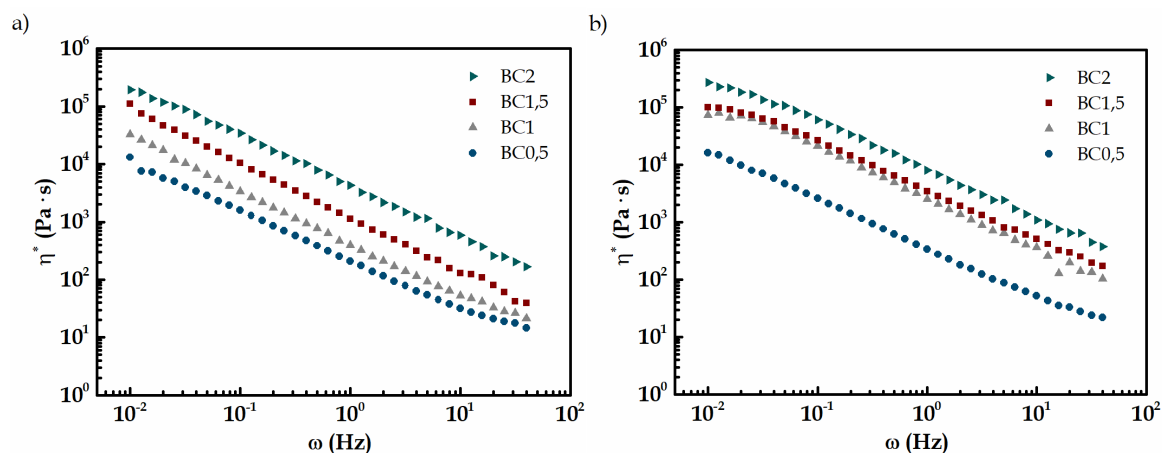


Figura 7.6. Viscosidad compleja de los bionogelatos celulósicos formulados a a) 3 días de postgelificación y b) 7 días de postgelificación

Todos estos resultados reológicos sugirieron que a medida que la concentración de celulosa fue mayor en los bionogelatos formulados, las interacciones entre el ChLys y la celulosa también se incrementaron. Estas interacciones fueron físicas debido a los puentes de hidrógeno formados entre las aminas y el carboxilato del ChLys con el grupo hidroxilo de las cadenas de celulosa. Las interacciones electrostáticas entre el nitrógeno de la colina y el oxígeno terminal de la lisina también se podrían dar, tanto con la celulosa como con ella misma, lo que está en concordancia con Scarpellini *et al.* (2016). El agua también puede jugar un papel fundamental en la gelificación de los bionogelatos, ayudando a la formación de puntos de reticulación física, al igual que en los ionogelatos de BmimCl y celulosa formulados anteriormente (apartado 6.3.1.3). En la Figura 7.7 se muestra el mecanismo propuesto para la formación de los bionogelatos celulósicos.

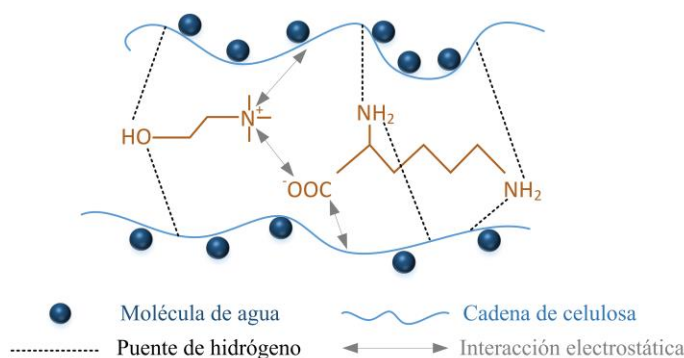


Figura 7.7. Mecanismo de formación de los bionogelatos celulósicos

Para comprobar que las fuerzas de interacción en los bionogelatos eran físicas, se realizaron ensayos de análisis de reflectancia total atenuada con FTIR (FTIR/ATR). En la Figura 7.8 se muestran los resultados de estos ensayos

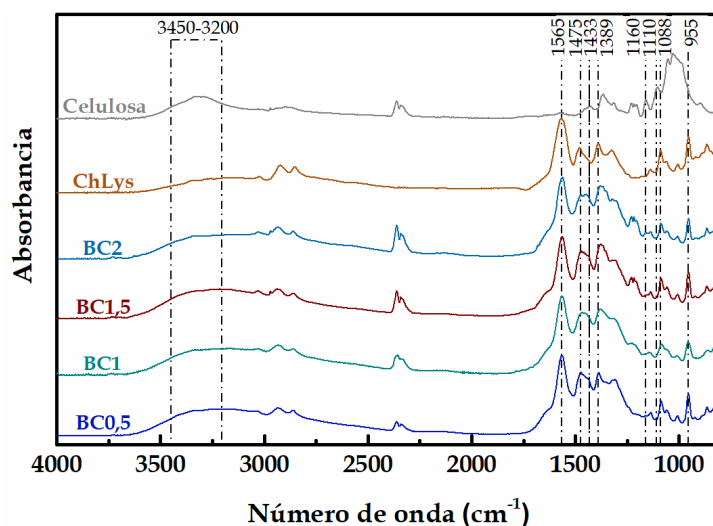


Figura 7.8. FTIR/ATR de la celulosa, el ChLys y de los bionogel celulosicos formulados

Los espectros de la celulosa y del ChLys mostraron las bandas características de estos compuestos. Las bandas entre 3400 y 3200 cm^{-1} del espectro de la celulosa corresponden a las vibraciones de estiramiento O-H. La banda a 1433 cm^{-1} está asociada a la atracción intermolecular del hidrógeno en el C6 del grupo del anillo aromático. Las bandas de 1160 y 1110 cm^{-1} se deben al estiramiento de C-O-C y al estiramiento asimétrico del anillo, respectivamente (Trache *et al.*, 2016; Rigual *et al.*, 2017). Por otro lado, el espectro de ChLys exhibió una banda ancha entre 3450 y 3100 cm^{-1} , asociada a estiramientos de O-H y N-H. La banda a 1565 cm^{-1} corresponde a un estiramiento asimétrico del enlace C=O. La banda de 1475 cm^{-1} está asociada a la vibración del estiramiento del grupo CH_3 . Además, la banda a 1389 cm^{-1} se debe al estiramiento simétrico del grupo CO_2 . A 1088 cm^{-1} se detecta la banda correspondiente a la torsión del grupo CH_n . Finalmente, la banda a 955 cm^{-1} está relacionada con el estiramiento de C-N (Campetella *et al.*, 2015). Para todos los bionogel se observaron las bandas del ChLys y de la celulosa superpuestas, sin nuevas bandas que indicaran nuevos enlaces químicos; por ello, las interacciones entre la celulosa y el ChLys fueron físicas.

Además del FTIR/ATR, los bionogel celulosicos se lavaron con agua (como en el caso de los ionogel celulosicos reforzados con quitosano) para comprobar si se mantenía la red tridimensional de la celulosa precipitada, formándose el hidrogel (Publicación II, Anexo II). En los dos casos se ratificó que las fuerzas de interacción entre el ChLys y la celulosa eran físicas, probando de esta forma que el modelo propuesto es factible.

7.4.3. Selección del porcentaje de celulosa en el bionogel

Con el fin de seleccionar el bionogel celulosico con las mejores propiedades reológicas, en la Figura 7.9 se muestra un resumen de los valores de los módulos G' , G'' para la frecuencia de 4 Hz, y del G_0 para los tiempos de postgelificación estudiados.

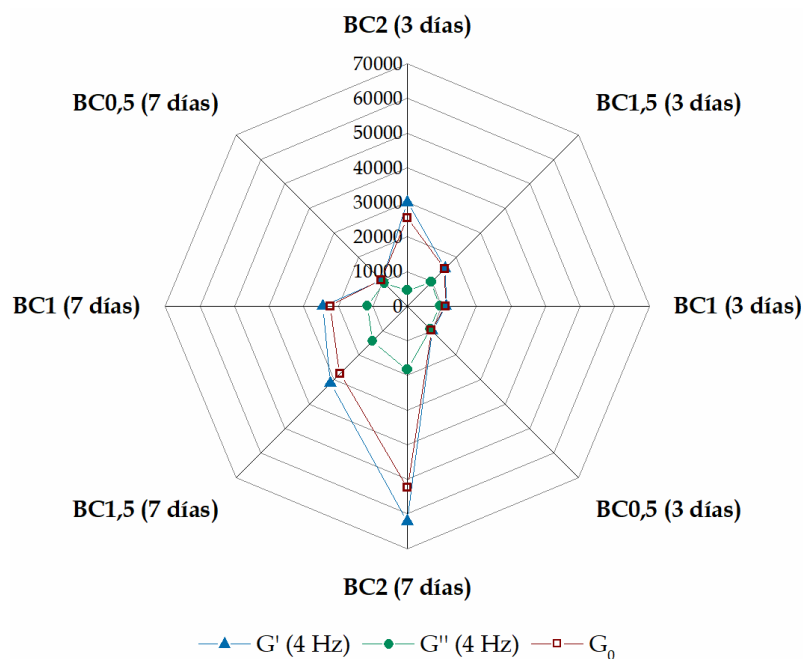


Figura 7.9. Valores de los módulos G' y G'' , y del G_0 , en Pa, de los bionogel celulósicos formulados. (): indica el tiempo de postgelificación

Se puede observar cómo, a los 3 días de postgelificación, para cada bionogel formulado las propiedades son mucho menores que a 7 días de postgelificación. Como se indicó en el apartado 7.3.2, a 3 días de postgelificación en bionogel sigue evolucionando y se siguen formando interacciones entre el ChLys y la celulosa. Por este motivo, se ha seleccionado el porcentaje de celulosa con los resultados obtenidos a 7 días de postgelificación. En este sentido, el bionogel con mejores propiedades reológicas es el bionogel BC2, por tanto, se ha seleccionado el 2 % como la concentración de celulosa más adecuada para formar la matriz de los bionogel celulósicos reforzados.

7.5. Bionogel celulósicos reforzados con quitosano

Los bionogel celulósicos reforzados con diferentes cargas de quitosano se caracterizaron mediante reología y análisis antimicrobiano. En este apartado se recogen los resultados y la discusión de dichas caracterizaciones para, por último, seleccionar la carga de quitosano que proporcione las mejores propiedades al bionogel celulósico reforzado.

7.5.1. Comportamiento viscoelástico y mecanismo de formación del bionogel reforzado

Los espectros obtenidos mediante los barridos de tiempo mostraron que el módulo complejo y la viscosidad compleja no variaron significativamente, por lo que los bionogel celulósicos reforzados fueron estables durante el tiempo de medida de los ensayos reológicos llevados a cabo

(Publicación IV del Anexo II). En la Tabla 7.6 se recogen los valores de los límites de la RLV para los bionogeles reforzados obtenidos.

Tabla 7.6. Valores de γ_c de los bionogeles celulósicos reforzados formulados

Ionogel	γ_c (%)
B0,25	0,011
B0,5	0,017
B0,75	0,008
B1	0,005
BD54	0,005

Los bionogeles reforzados que mostraron mayor capacidad de deformación sin modificar su estructura interna fueron las muestras B0,25 y B0,5. Al contrario, la muestra B1 presentó el valor más bajo de γ_c , por lo que su estructura interna fue la más fuerte de los bionogeles reforzados estudiados. Esto es debido a que este bionogel, al contener más carga de quitosano, interacciona más fuertemente con la matriz. El valor de γ_c para el bionogel BD54 fue el mismo que para la muestra B1, indicando que la RLV no varía con el DD del refuerzo. Estos resultados difieren de los obtenidos con los ionogeles celulósicos reforzados (Capítulo 6), en los cuales el γ_c se modificaba al cambiar el DD del quitosano. Esto se debe a que la carga de quitosano en los bionogeles fue menor (3 % p/p) que la utilizada para el refuerzo de los ionogeles.

Las RLV de los bionogeles formulados fueron menores en comparación con la RVL de la matriz (γ_c del bionogel BC2=0,019 %). Así pues, al introducir el refuerzo de quitosano, el bionogel resultó tener un comportamiento más rígido (Hull y Clyne, 1996). Esto se debe a que el quitosano y la matriz están interaccionando más fuertemente en el bionogel celulósico.

Con respecto a los espectros reológicos obtenidos mediante los ensayos dinámicos de frecuencia, en la Figura 7.10 se muestran los resultados del módulo elástico y del módulo viscoso para cada bionogel formulado. Dichos espectros mostraron un incremento de G' al aumentar la carga de quitosano, con excepción de las muestras B0,75 y B0,5, cuyos comportamientos fueron prácticamente iguales. Los valores del módulo G' , para 4 Hz, fueron 95,6; 197; 223 y 552 kPa para los bionogeles B0,25, B0,5, B0,75 y B1, respectivamente. El bionogel que mostró los valores más altos de este módulo fue la muestra B1 y, por ello, presentó un comportamiento más sólido que el resto de las muestras. Para el módulo G'' se observó la misma tendencia que para el módulo G' , siendo los valores para 4 Hz de 2, 35, 43 y 99 kPa para los materiales B,025, B0,5, B0,75 y B1, respectivamente.

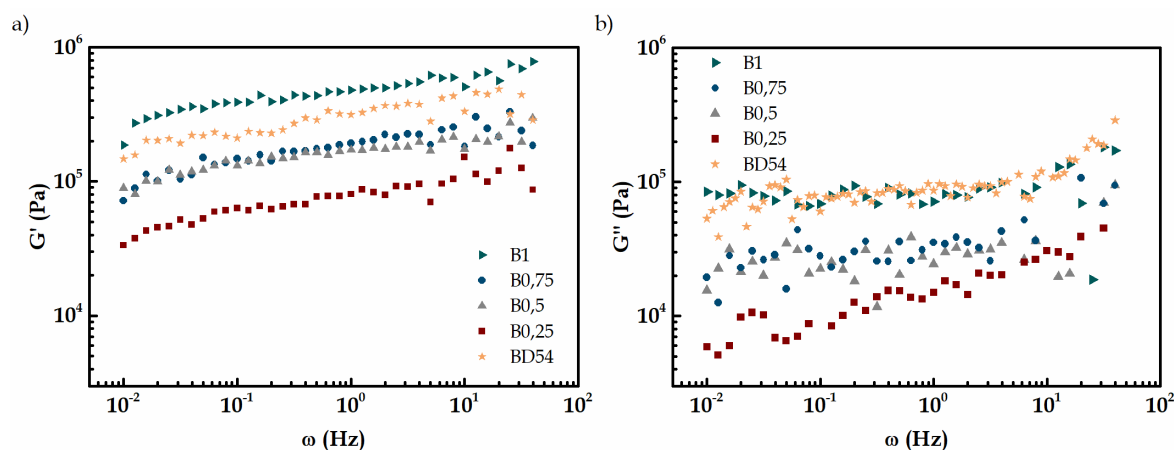


Figura 7.10. Espectros reológicos de los bionogel celulósicos reforzados formulados. (a) Módulo elástico, G' , y (b) módulo viscoso, G''

Los módulos obtenidos en los espectros de los bionogel reforzados con quitosano fueron significativamente más altos que los obtenidos para la matriz (apartado 7.4.2). En consecuencia, la adición de quitosano mejoró el comportamiento elástico y viscoso de los materiales.

En cuanto al DD del quitosano utilizado como refuerzo, para 4 Hz, el valor de G' para la muestra BD54 fue de 374 kPa, lo cual supone un módulo elástico 1,5 veces superior al que presenta la muestra B1. Sin embargo, el valor del G'' fue similar para las dos muestras, en torno a 99 kPa. Por tanto, se observó que el DD del quitosano sólo afectó al comportamiento elástico y no al viscoso de los bionogel, contrariamente a lo observado en los espectros de los ionogel reforzados con quitosano, lo que sugiere que se mejoran las propiedades elásticas del material con la matriz de ChLys y celulosa, que no las viscosas.

En la Tabla 7.7 se recogen los valores de G_0 de los bionogel reforzados, que se han obtenido a partir la Ecuación 6.1, así como los parámetros de dicha ecuación y la relación entre módulos G'/G'' para 4 Hz.

Tabla 7.7. Valores de los parámetros del ajuste potencial del módulo elástico y relación G'/G'' para 4 Hz de los espectros de los bionogel celulósicos formulados

Bionogel	$a \pm SD^*$	$G_0 \pm SD^*$ (Pa)	R^2	G'/G'' (4 Hz)
B0,25	$0,137 \pm 0,005$	78674 ± 1	0,907	4,7
B0,5	$0,110 \pm 0,004$	166886 ± 1	0,918	5,5
B0,75	$0,123 \pm 0,007$	182860 ± 1	0,828	5,2
B1	$0,106 \pm 0,004$	474089 ± 1	0,918	5,6
BD54	$0,126 \pm 0,006$	311085 ± 1	0,854	3,8

* SD: desviación estándar

Los valores del parámetro “a” para todos los casos son superiores a cero, por lo que las interacciones de los bionogel formulados fueron de tipo físico. Los valores de la fuerza de gel

aumentaron al incrementar la carga de quitosano. En consecuencia, el bionogel B1 fue el más fuerte de los bionogel reforzados estudiados. Además, los valores de G_0 de los bionogel reforzados fueron en todos los casos superiores a los de la matriz (BC2).

Al igual que en el caso de los ionogel celulosicos reforzados con quitosano del Capítulo 6, al aumentar el DD del quitosano, mejora el G_0 debido a capacidad de formar mayores interacciones de puente de hidrógeno. Por tanto, el comportamiento de la fuerza de gel con respecto al DD fue el mismo que para los ionogel formulados con el líquido iónico BmimCl.

Los bionogel reforzados con quitosano formulados exhibían espectros ligeramente dependientes de la frecuencia en el intervalo estudiado (Figura 7.10). Los bionogel mostraron un comportamiento intermedio entre gels fuertes y débiles debido a la dependencia de los módulos con la frecuencia y la forma de los espectros. Según la relación entre los módulos G'/G'' (Tabla 7.7), los valores de estas relaciones eran menores de 10 para todos los bionogel (entre 3,8 y 4,7). Por lo tanto, los bionogel reforzados con quitosano pueden clasificarse como gels físicos débiles.

Los bionogel reforzados mostraron un comportamiento pseudoplástico según los resultados obtenidos para la viscosidad compleja (Figura 7.11). La carga de quitosano influyó de la misma forma que para el módulo G' favoreciendo la viscosidad compleja, menos para los bionogel B0,5 y B0,75 que mostraron valores similares. De nuevo, la muestra B1 mostró los mayores valores de viscosidad compleja y, con ello, mayor resistencia a la deformación.

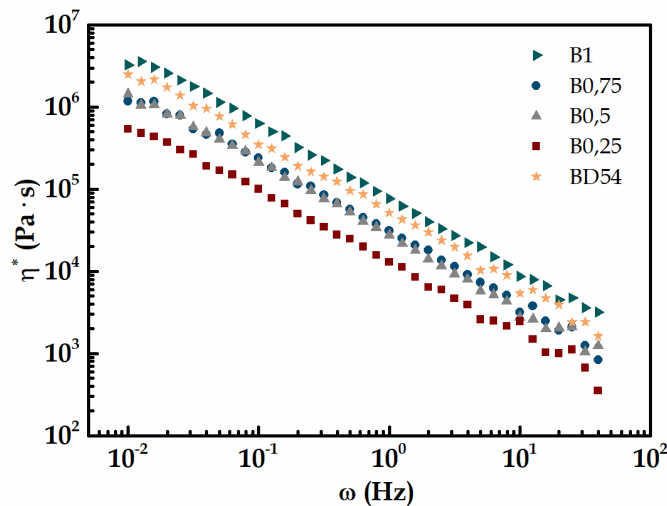


Figura 7.11. Viscosidad compleja de los bionogel celulosicos reforzados con quitosano

En la Figura 7.12 se muestra el mecanismo de formación de los bionogel reforzados, atendiendo al estudio reológico realizado. Este mecanismo consiste en el hospedaje de las partículas de quitosano dentro de la matriz. Las interacciones que mantienen unido el refuerzo y la matriz se

basan en los puentes de hidrógeno que se dan entre el quitosano y las cadenas de celulosa. Estas uniones se fortalecen a medida que la carga de quitosano en el bionogel celulosico es mayor.

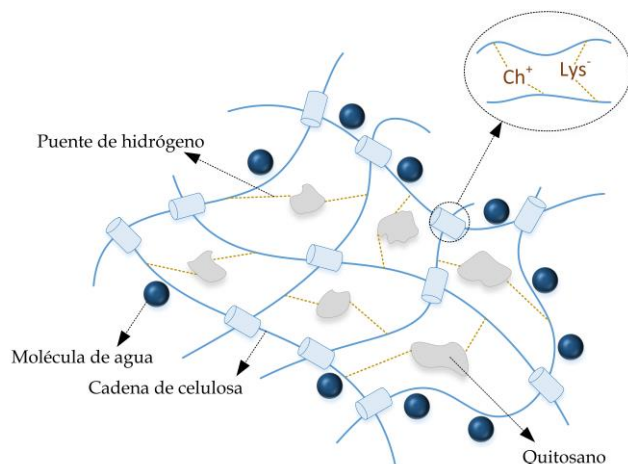


Figura 7.12. Mecanismo de formación del bionogel celulosico reforzado con quitosano

Este mecanismo se ha verificado lavando el bionogel reforzado con agua, como se realizó en los apartados 6.3.1.3 y 7.4.2, manteniéndose la estructura tridimensional del material. En la Publicación IV (Anexo II) de la presente tesis doctoral se recogen las fotografías de dichos ensayos.

7.5.2. Capacidad antimicrobiana

En la Figura 7.13 se muestran las imágenes de los resultados de los ensayos de análisis de la capacidad antimicrobiana, en la cual se puede observar cómo alrededor del disco de celulosa que sostiene la muestra hay un área en el que no hay presencia de bacterias.

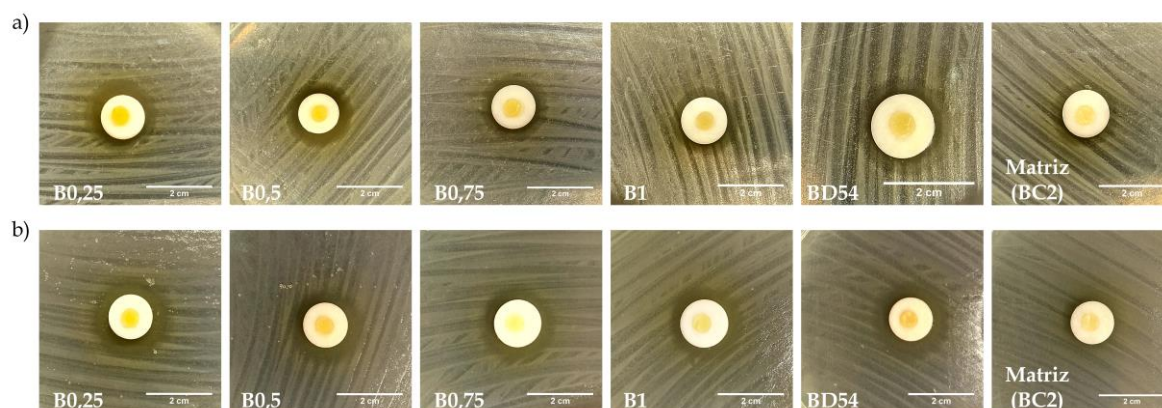


Figura 7.13. Fotografías de los ensayos antimicrobianos de los bionogel celulosicos reforzados con quitosano y de su matriz frente a las bacterias (a) *S. aureus* y (b) *E. coli*

En la Figura 7.14 se recogen los diámetros de inhibición. Dichos diámetros no mostraron diferencias significativas al aumentar la carga de quitosano para las bacterias estudiadas, siendo el

aura de inhibición mínima observada de 4 y 6 mm para *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente. El efecto de inhibición sobre la bacteria *E. coli* fue mayor que sobre la *S. aureus* en todos los casos; por tanto, los bionogeles reforzados fueron más eficaces en la inhibición de la bacteria de tipo Gram-negativa. La incorporación del quitosano a la matriz tuvo un efecto antimicrobiano significativo debido a la presencia de grupos amino. Por ejemplo, en comparación con la muestra B1, la capacidad antimicrobiana de esta muestra fue de un 38 % y un 15 % superior que la de la matriz (BC2) para las bacterias *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente.

Para la muestra BD54, la capacidad antibacteriana estaba de acuerdo con la observada para los otros bionogeles reforzados. Sin embargo, su diámetro promedio de inhibición frente a la bacteria *E. Coli* fue casi un 10 % mayor que el de la muestra de B1. Esta diferencia podría ser causada por la inhibición del quitosano debido a la presencia de grupos aminos (Fangbing *et al.*, 2014; Fardioui *et al.*, 2018). Aunque la muestra de B1 tenía más grupos aminos en su refuerzo que la muestra de BD54, la disponibilidad de estos grupos para la inhibición fue menor debido a que éstos estaban formando más puentes de hidrógeno con la celulosa que con la muestra de BD54, como revelaron los espectros reológicos.

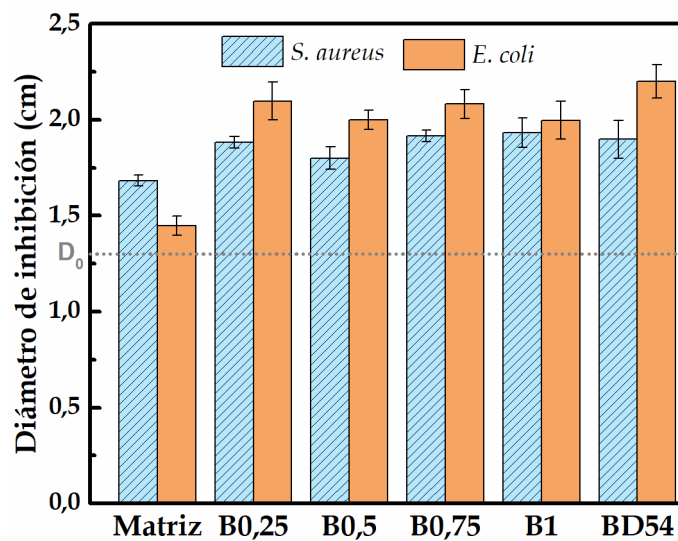


Figura 7.14. Diámetros de inhibición obtenidos del estudio de capacidad antibacteriana de los bionogeles celulósicos reforzados con quitosano

Otros autores también han encontrado que la formulación de materiales con quitosano ofrece buenas propiedades antimicrobianas para el sector médico/farmacéutico (Simões *et al.*, 2018). En concreto, varios de estos autores se centran en la posibilidad de utilizar materiales para el tratamiento de heridas como, por ejemplo, Flores *et al.* (2017), que proponen esponjas de quitosanos y ciclodextrina, cuya capacidad antimicrobiana máxima obtenida es de 2,4 cm de inhibición para la bacteria *S. aureus*. También, Poonguzhali *et al.* (2017) desarrollaron películas formuladas por quitosano/poli (vinil pirrolidona)/nanocelulosa que presentaban una inhibición frente a la bacteria

S. aureus de entre 1 y 1,2 cm. Adeli *et al.* (2019) formularon apósitos de quitosano/poli (vinil alcohol)/almidón cuya capacidad antimicrobiana fue de entre un 50-80 % para la *E. coli*, y de un 60-83 % para la *S. aureus*. Por lo tanto, los bionogel celulosicos reforzados con quitosano han mostrado una capacidad antibacteriana que los hace potencialmente útiles en el sector médico/farmacéutico.

7.5.3. Selección de la carga de quitosano en el bionogel reforzado

Como las propiedades antibacterianas de los bionogel reforzados son similares, se ha seleccionado la carga de refuerzo atendiendo a sus propiedades reológicas. En la Figura 7.15 se resumen los valores de los módulos G' y G'' para una frecuencia intermedia de 4 Hz y de la G_0 para los bionogel reforzados estudiados con un quitosano con un DD del 84 %, seleccionado en el capítulo anterior, y diferentes cargas del mismo.

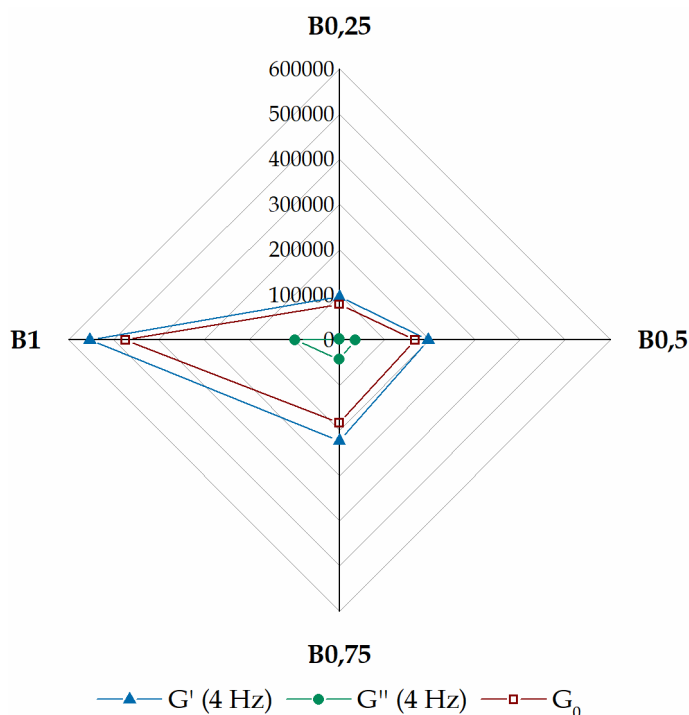


Figura 7.15. Valores de los módulos G' y G'' , y del G_0 , en Pa, de los bionogel celulosicos reforzados.

El bionogel que presenta las mejores propiedades reológicas es el B1, como se puede apreciar en la Figura 7.15. La diferencia entre las propiedades reológicas de este bionogel y los del resto de los bionogel reforzados estudiados es bastante significativa. Por este motivo, la carga de quitosano (DD=84 %) seleccionada para el estudio de los bionogel reforzados es del 1 %.

Las propiedades reológicas del bionogel elegido en esta tesis doctoral, el material B1, se ha comparado con hidrogel formulados por otros autores para el sector médico/farmacológico en los

últimos años (Tabla 7.8). Los valores de las propiedades reológicas del bionogel B1 son superiores a los obtenidas por otros autores. De esta forma, en la presente tesis doctoral se ha conseguido la formulación de nuevos materiales tipo gel con propiedades mecánicas más elevadas que las de los hidrogeles destinados al sector médico/farmacológico.

Tabla 7.8. Propiedades reológicas de hidrogeles de uso médico/farmacológico

Hidrogel	G' (Pa)	G'' (Pa)	G ₀ (Pa)	Referencia
Citosina y guanosina	10 ³ -10 ⁵	10 ³ -10 ⁴	-	Ye <i>et al.</i> (2017)
Quitosano, glicerofosfato y β-ciclodextrina fosforilada	1-200	0,3-10	-	Barragán <i>et al.</i> (2018)
Quitosano, poli(ácido glutámico) y alginato	10 ³ -10 ⁴	200-10 ³	-	Chen <i>et al.</i> (2018)
Fibra de seda, quitosano, agarosa y partículas de Ag	10 ³ -10 ⁵	70-10 ⁴	-	Chen <i>et al.</i> (2019)
Xantano, pululano y gellan	~10 ⁵	~10 ³	10 · 10 ³ -42 · 10 ³	Kalia y Choudhary (2019)
Gellan y pululano	~10 ³	~10 ³	3,4 · 10 ³ -16 · 10 ³	Choudhury (2019)
Poli(alcohol vinílico), poli(etilenglicol) y nanocompuesto de arcilla	10 ³ -10 ⁴	100-10 ³	-	Ghanaatian y Entezam (2019)
Pectina y goma brea	400-800	70-100	-	Slavutsky y Bertuzzi (2019)
Queratina e insulina	30-180	10-100	-	Li <i>et al.</i> (2019a)
Bionogel celulósico B1	187 · 10 ³ -781 · 10 ³	84 · 10 ³ -172 · 10 ³	474 · 10 ³	Tesis Doctoral

Además, el bionogel B1 es un material biodegradable e inócuo (debido a las propiedades de los materiales que lo componen), respetuoso con el medioambiente y que tiene propiedades antimicrobianas. Por tanto, debido a todas estas propiedades, se cumple el objetivo principal de la presente tesis doctoral, el cual es el de llegar a un bionogel de estas características.

Capítulo 8

Conclusiones



8. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en la investigación realizada y de su discusión se pueden extraer las siguientes conclusiones:

Determinación del grado de desacetilación del quitosano

- Las técnicas de ^1H RMN, TGA y FTIR estudiadas son adecuadas para la determinación del grado de desacetilación del quitosano, ya que presentaron errores inferiores al 5 %.
- La determinación del grado de desacetilación del quitosano mediante FTIR frente al resto de las técnicas estudiadas se seleccionó como la más adecuada.

Obtención y caracterización de los quitosanos utilizados como refuerzo

- La relación entre la concentración de NaOH utilizada en la desacetilación de la quitina y el grado de desacetilación del quitosano obtenido fue de tipo logarítmica. De esta forma, se pudo predecir la concentración de NaOH necesaria para la obtención de los quitosanos con un determinado grado de desacetilación.
- La cristalinidad de los quitosanos C54 (grado de desacetilación del 54 %) y la del C62 (grado de desacetilación del 62 %) fueron superiores que para el resto de las muestras estudiadas debido a la mayor presencia de grupos acetilo en el polímero.
- El quitosano C54 fue el más estable térmicamente debido a su cristalinidad y su comportamiento térmico fue muy similar al de la quitina de partida.

- Los quitosanos obtenidos son estables a la temperatura de formulación de los ionogel y de los bionogel.
- Los pesos moleculares promedios viscosos determinados para los quitosanos obtenidos presentaron un orden de magnitud similar de en torno a 10^6 g/mol.

Ionogel celulósicos convencionales reforzados con quitosano

- Las propiedades reológicas de los ionogel reforzados formulados presentaron una fuerte dependencia del grado de desacetilación del quitosano. Los módulos elástico y viscoso, así como la fuerza de gel y la viscosidad compleja, de forma general, aumentaron con el grado de desacetilación del refuerzo debido al aumento de las interacciones entre la matriz y el mismo.
- En base a los resultados de la caracterización reológica, el mecanismo de formación del ionogel celulósico reforzado con quitosano tiene lugar mediante interacciones físicas fuertes (gel físico fuerte) de tipo puente de hidrógeno entre la matriz y el refuerzo.
- Las propiedades térmicas de los ionogel reforzados formulados fueron independientes del grado de desacetilación del quitosano porque el valor de la T_g fue de en torno a -98 °C y el de la T_f de 40 °C para todos los ionogel estudiados.
- El ionogel que mejores propiedades reológicas presentó fue el Gel84 (G' $\sim 10,6$ kPa, G'' (1 Hz): $1,3$ kPa y G_0 : $15,8$ kPa). Es decir, el quitosano con un grado de desacetilación del 84 % es el refuerzo más adecuado para obtener ionogel con elevadas propiedades reológicas.

Bionogel celulósicos sin refuerzo de quitosano

- El líquido iónico de base de colina y aminoácido elegido para la formulación de los bionogel celulósicos fue el lisinato de colina debido a la interacción que mostró con la celulosa tanto en la disolución como en la gelificación.
- Los espectros reológicos revelaron que la concentración de celulosa del bionogel influyó en las propiedades reológicas de los mismos, siendo el bionogel BC2 (2 % de celulosa) el material con los mayores módulos, fuerza de gel y viscosidad compleja. Esto se debe al aumento de las interacciones que produce esta concentración de celulosa con el líquido iónico.
- Los bionogel celulósicos se clasificaron como geles físicos débiles, siendo el mecanismo de formación del material por puentes de hidrógeno entre el líquido iónico y la celulosa.

- El bionogel seleccionado debido a sus buenas propiedades reológicas fue el BC2 (G' (4 Hz): 61 kPa, G'' (4 Hz): 11 kPa y G_0 : 49,8 kPa). Esto es, la concentración del 2 % de celulosa fue la elegida para formar la matriz de los bionogeles celulósicos reforzados con quitosano.

Bionogeles celulósicos con refuerzo de quitosano

- Las propiedades reológicas (módulos elástico y viscoso, fuerza de gel y viscosidad compleja) de los bionogeles reforzados aumentaron con la carga de quitosano. En todos los casos, las propiedades fueron mayores que las que presentó la matriz por la formación interacciones entre ésta y el refuerzo que mejoraron sus propiedades mecánicas.
- Los bionogeles celulósicos reforzados, al igual que los bionogeles celulósicos sin quitosano, se clasificaron como geles físicos débiles. Las interacciones fueron más fuertes al aumentar la carga y el grado de desacetilación del quitosano.
- Los bionogeles reforzados mostraron una capacidad antibacteriana buena por la presencia de grupos amino, siendo un 38 y un 15 % superior a la de la matriz frente a las bacterias *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente.
- El bionogel celulósico reforzado con quitosano seleccionado fue el B1 (1 % de carga de quitosano), ya que fue el material que presentaba las mejores propiedades reológicas (G' (4 Hz): 552 kPa, G'' (4 Hz): 99 kPa y G_0 : 474 kPa). Estas propiedades, junto con su inocuidad, biodegradabilidad y su capacidad antibacteriana, hacen que estos materiales presenten un gran potencial de uso en el área médica/farmacológica.

The image shows three petri dishes arranged horizontally, each containing a bacterial culture on a nutrient agar surface. The cultures are represented by multiple parallel, diagonal streaks of varying lengths and thicknesses, extending from the center towards the edges of the dishes. The agar is a light, translucent color. In the center of each dish, there is a small, circular, white, solid object, likely a piece of cotton or a filter. Two horizontal dark blue lines are drawn across the dishes, one above and one below the text. The text 'Capítulo 9' is positioned above the lower line, and 'Nomenclatura' is positioned below the upper line, both centered across the three dishes.

Capítulo 9
Nomenclatura

9. Nomenclatura

a	Parámetro del modelo potencial del módulo elástico
API	Ingrediente farmacéutico activo
A ₁₃₂₀	Absorbancia en la banda de 1320 cm ⁻¹
A ₁₄₂₀	Absorbancia en la banda de 1420 cm ⁻¹
A _{m 1320}	Absorbancia media en la banda de 1320 cm ⁻¹
A _{m 1420}	Absorbancia media en la banda de 1420 cm ⁻¹
BmimCl	Cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio
BC0,5	Bionogel con una concentración de celulosa del 0,5 %
BC1	Bionogel con una concentración de celulosa del 1 %
BC1,5	Bionogel con una concentración de celulosa del 1,5 %
BC2	Bionogel con una concentración de celulosa del 2 %
BD54	Bionogel celulósico reforzado con quitosano al 1 % con un DD del 54 %
B0,25	Bionogel celulósico reforzado con quitosano al 0,25 % con un DD del 84 %
B0,5	Bionogel celulósico reforzado con quitosano al 0,5 % con un DD del 84 %
B0,75	Bionogel celulósico reforzado con quitosano al 0,75 % con un DD del 84 %
B1	Bionogel celulósico reforzado con quitosano al 1 % con un DD del 84 %
ChAAIL	Líquidos iónicos basados en colina y aminoácido


ChArg	Líquido iónico arginato de colina
ChIsol	Líquido iónico isolucinato de colina
ChLys	Líquido iónico lisinato de colina
CrI	Índice de cristalinidad (%)
ChSer	Líquido iónico serinato de colina
CFU	Unidad formadora de colonias
¹³ C RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
C54	Quitosano con un DD de 54 %
C62	Quitosano con un DD de 62 %
C69	Quitosano con un DD de 69 %
C77	Quitosano con un DD de 77 %
C84	Quitosano con un DD de 84 %
DD	Grado de desacetilación (%)
DP	Grado de polimerización (%)
DSC	Calorímetro de barrido diferencial
DTG	Primera derivada de la curva TG
D ₀	Diámetro de los discos de celulosa esterilizados (13 mm)
FTIR	Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier
FTIR/ATR	Espectroscopía de reflectancia total atenuada con Transformada de Fourier
Gel54	Ionogel celulósico convencional reforzado con un quitosano con un DD de 54%
Gel62	Ionogel celulósico convencional reforzado con un quitosano con un DD de 62%
Gel69	Ionogel celulósico convencional reforzado con un quitosano con un DD de 69%
Gel77	Ionogel celulósico convencional reforzado con un quitosano con un DD de 77%
Gel84	Ionogel celulósico convencional reforzado con un quitosano con un DD de 84%
Glc	Unidades D-glucosamina del quitosano
GlcNAc	Unidades N-acetil-D-glucosamina del quitosano
G*	Módulo complejo de cizalla (Pa)
G'	Módulo elástico de cizalla (Pa)

G''	Módulo viscoso de cizalla (Pa)
G_0	Fuerza del gel (Pa)
^1H RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
I_{am}	Intensidad de la difracción amorfa
IR	Infrarrojo
$I_{\text{H-Ac}}$	Integral de la señal de la banda H-Ac
$I_{\text{H 2-6}}$	Integral de la señal de la banda H 2-6
IUPAC	Unión Internacional de la Química Pura y Aplicada
I_{110}	Intensidad máxima de la red de difracción
K	Parámetro de la ecuación de Mark-Houwink
MCC	Celulosa microcristalina
M_v	Peso molecular promedio viscoso
M_w	Peso molecular promedio
n	Parámetro de la ecuación de Mark-Houwink
RMN	Resonancia magnética nuclear
^{15}N RMN	Resonancia magnética nuclear de nitrógeno
PET	Tereftalato de polietileno
RLV	Región lineal viscoelástica
SEC	Cromatografía de exclusión de tamaño
SD	Desviación estándar
SLS	Dispersión de luz estática
t	Tiempo (s)
T	Transmitancia (%)
T_g	Temperatura de transición vítrea ($^{\circ}\text{C}$)
TG	Termograma
TGA	Análisis termogravimétrico
T_f	Temperatura de fusión ($^{\circ}\text{C}$)

T_{1320}	Transmitancia en la banda de 1320 cm^{-1} (%)
T_{1420}	Transmitancia en la banda de 1420 cm^{-1} (%)
$T_{25\%}$	Temperatura al 25 % de la conversión en base seca
UV-VIS	Ultravioleta visible

Símbolos griegos

γ	Deformación (%)
γ_c	Límite de la región lineal viscoelástica (%)
γ_0	Amplitud de la deformación (%)
Γ_2	Segundo coeficiente viral
δ	Ángulo de fase respecto a la deformación sinusoidal (°)
Δm	Porcentaje de pérdida de masa (%)
η	Viscosidad intrínseca (mL/mg)
η^*	Viscosidad compleja (Pa s)
η'	Viscosidad de la componente elástica (Pa s)
η''	Viscosidad de la componente viscosa (Pa s)
τ^*	Tensión compleja (Pa)
τ'	Tensión generada por el comportamiento elástico (Pa)
τ''	Tensión generada por el comportamiento viscoso (Pa)
ω	Frecuencia (Hz)



Capítulo 10
Bibliografía

10. Bibliografía

- Abdou, E. S., Nagy, K. S. y Elsabee, M. Z. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, 99(5), 1359-1367.
- Adeli, H., Khorasani, M. T. y Parvazinia, M. (2019). Wound dressing based on electrospun PVA/chitosan/starch nanofibrous mats: Fabrication, antibacterial and cytocompatibility evaluation and in vitro healing assay. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 238-254.
- Adusei, P. K., Gbordzoe, S., Kanakaraj, S. N., Hsieh, Y.-Y., Alvarez, N. T., Fang, Y., Johnson, K., McConnell, C. y Shanov, V. (2020). Fabrication and study of supercapacitor electrodes based on oxygen plasma functionalized carbon nanotube fibers. *Journal of Energy Chemistry*, 40, 120-131.
- Akter, N., Khan, R. A., Tuhin, M. O., Haque, M. E., Nurnabi, M., Parvin, F. y Islam, R. (2014). Thermomechanical, barrier, and morphological properties of chitosan-reinforced starch-based biodegradable composite films. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 27(7), 933-948.
- Al Sagheer, F. A., Al-Sughayer, M. A., Muslim, S. y Elsabee, M. Z. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 410-419.
- Albanna, M. Z., Bou-Akl, T. H., Walters III, H. L. y Matthew, H. W. (2012). Improving the mechanical properties of chitosan-based heart valve scaffolds using chitosan fibers. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 5(1), 171-180.
- Alonso, J., Peniche-Covas, C. y Nieto, J. (1983). Determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan by thermal analysis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 28(1), 189-193.
- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. y Heras, Á. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, 3(2), 203-230.

- Baral, N. R., Kavvada, O., Mendez-Perez, D., Mukhopadhyay, A., Lee, T. S., Simmons, B. A. y Scown, C. D. (2019). Techno-economic analysis and life-cycle greenhouse gas mitigation cost of five routes to bio-jet fuel blendstocks. *Energy & Environmental Science*, 12(3), 807-824.
- Baranwal, A., Kumar, A., Priyadharshini, A., Oggu, G. S., Bhatnagar, I., Srivastava, A. y Chandra, P. (2018). Chitosan: An undisputed bio-fabrication material for tissue engineering and bio-sensing applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 110, 110-123.
- Barnes, H. A. (2000). *A handbook of elementary rheology*. University of Wales Aberystwyth, Wales, U. K.
- Barnes, H. A., Hutton, J. F. y Walters, K. (1989). *An introduction to rheology* (Vol. 3). Elsevier.
- Barragán, C. A. R., Balleza, E. R. M., García-Uriostegui, L., Ortega, J. A. A., Toríz, G. y Delgado, E. (2018). Rheological characterization of new thermosensitive hydrogels formed by chitosan, glycerophosphate, and phosphorylated β -cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers*, 201, 471-481.
- Baskar, D. y Kumar, T. S. (2009). Effect of deacetylation time on the preparation, properties and swelling behavior of chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 767-772.
- Baxter, A., Dillon, M., Taylor, K. y Roberts, G. (1992). Improved method for ir determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14(3), 166-169.
- Belgacem, M. y Gandini, A. (2008). *Monomers, polymers and composites from renewable resources*. Elsevier.
- Botella, R. M. (2005). *Reología de suspensiones cerámicas* (Vol. 17). Editorial CSIC-CSIC Press.
- Bothwell, K. M., Lorenzini, F., Mathers, E., Marr, P. C. y Marr, A. C. (2018). Basic Ionic Liquid Gels for Catalysis: Application to the Hydrogen Borrowing Mediated Dehydration of 1, 3-Propanediol. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(2), 2686-2690.
- Broussignac, P. (1968). Chitosan: a natural polymer not well known by the industry. *Chimie et Industrie Genie Chimique*, 99(9), 1241-1247.
- Brugnerotto, J., Desbrières, J., Roberts, G. y Rinaudo, M. (2001a). Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. *Polymer*, 42(25), 09921-09927.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J. y Rinaudo, M. (2001b). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42(8), 3569-3580.
- Brunner, M., Li, H., Zhang, Z., Zhang, D. y Atkin, R. (2019). Pinewood pyrolysis occurs at lower temperatures following treatment with choline-amino acid ionic liquids. *Fuel*, 236, 306-312.
- Campetella, M., Bodo, E., Caminiti, R., Martino, A., D'Apuzzo, F., Lupi, S. y Gontrani, L. (2015). Interaction and dynamics of ionic liquids based on choline and amino acid anions. *The Journal of Chemical Physics*, 142(23), 234502.
- Chae, I. S., Hong, G. H., Song, D., Kang, Y. S. y Kang, S. W. (2018). Enhanced Olefin and CO₂ Permeance Through Mesopore-Confined Ionic Liquid Membrane. *Macromolecular Research*, 1-5.

- Chae, Y. y An, Y.-J. (2018). Current research trends on plastic pollution and ecological impacts on the soil ecosystem: A review. *Environmental Pollution*, 240, 387-395.
- Chang, K. L. B., Tsai, G., Lee, J. y Fu, W.-R. (1997). Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Research*, 303(3), 327-332.
- Chen, C., Li, D. y Shao, X. (2014). High-performance nanocomposite films: reinforced with chitosan nanofiber extracted from prawn shells. *Journal of Materials Science*, 49(3), 1215-1221.
- Chen, H., Xing, X., Tan, H., Jia, Y., Zhou, T., Chen, Y., Ling, Z. y Hu, X. (2017). Covalently antibacterial alginate-chitosan hydrogel dressing integrated gelatin microspheres containing tetracycline hydrochloride for wound healing. *Materials Science and Engineering-C*, 70, 287-295.
- Chen, S.-H., Li, Z., Liu, Z.-L., Cheng, L., Tong, X.-L. y Dai, F.-Y. (2019). Antimicrobial hydrogels with controllable mechanical properties for biomedical application. *Journal of Materials Research*, 1-11.
- Chen, Y., Yan, X., Zhao, J., Feng, H., Li, P., Tong, Z., Yang, Z., Li, S., Yang, J. y Jin, S. (2018). Preparation of the chitosan/poly (glutamic acid)/alginate polyelectrolyte complexing hydrogel and study on its drug releasing property. *Carbohydrate Polymers*, 191, 8-16.
- Choudhury, A. R. (2019). Synthesis and rheological characterization of a novel thermostable quick setting composite hydrogel of gellan and pullulan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 979-988.
- Corazzari, I., Nisticò, R., Turci, F., Faga, M. G., Franzoso, F., Tabasso, S. y Magnacca, G. (2015). Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. *Polymer Degradation and Stability*, 112, 1-9.
- D'Este, M., Alvarado-Morales, M. y Angelidaki, I. (2018). Amino acids production focusing on fermentation technologies—a review. *Biotechnology Advances*, 36(1), 14-25.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M. y Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36(8), 981-1014.
- de Barros-Alexandrino, T. T., Tosi, M. M. y Assis, O. B. G. (2019). Comparison Between Chitosan Nanoparticles and Cellulose Nanofibers as Reinforcement Fillers in Papaya Puree Films: Effects on Mechanical, Water Vapor Barrier, and Thermal Properties. *Polymer Engineering & Science*, 59(S1), E287-E292.
- de María, P. D. (2012). *Ionic liquids in biotransformations and organocatalysis: solvents and beyond*. John Wiley & Sons.
- Diañez, I., Gallegos, C., Brito-de la Fuente, E., Martínez, I., Valencia, C., Sánchez, M., Diaz, M. y Franco, J. (2019). 3D printing in situ gelification of κ -carrageenan solutions: Effect of printing variables on the rheological response. *Food Hydrocolloids*, 87, 321-330.
- Dong, Y., Ruan, Y., Wang, H., Zhao, Y. y Bi, D. (2004). Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques. *Journal of Applied Polymer Science*, 93(4), 1553-1558.

- Duarte, M. L., Ferreira, M. C., Marvao, M. R. y Rocha, J. (2001). Determination of the degree of acetylation of chitin materials by ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28(5), 359-363.
- Duarte, M. L., Ferreira, M. C., Marvao, M. R. y Rocha, J. (2002). An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31(1), 1-8.
- Egorova, K. S., Gordeev, E. G. y Ananikov, V. P. (2017). Biological activity of ionic liquids and their application in pharmaceuticals and medicine. *Chemical Reviews*, 117(10), 7132-7189.
- Escobar Sierra, D. M., Castro Ramírez, A. M. y Vergara Castrillón, N. A. (2014). Determining the Relation between the Proportion of the Amino Group and the Degree of Deacetylation of Chitosan. *Revista de Ciencias*, 18(1), 73-88.
- Fan, Z., Xie, C., Chen, J., Sun, S. y Zhou, Q. (2019). Interesting core-shell structure and “V-shape” shift: The property and formation mechanism of structural heterogeneity in cellulose hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, 217, 110-115.
- Fangbing, L., Wang, C., Zhu, P. y Zhang, C. (2014). Characterization of chitosan microparticles reinforced cellulose biocomposite sponges regenerated from ionic liquid. *Cellulose*, 21(6), 4405-4418.
- Fardioui, M., Kadmiri, I. M., el kacem Qaiss, A. y Bouhfid, R. (2018). Bio-active nanocomposite films based on nanocrystalline cellulose reinforced styrylquinoxalin-grafted-chitosan: Antibacterial and mechanical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 733-740.
- Ferenc Horkay, J. F. D. (2018). Polymer Gels: Basics, Challenges, and Perspectives. *Gels and Other Soft Amorphous Solids* (Vol. 1296, pp. 1-13). ACS Symposium Series (Ed.). American Chemical Society.
- Fernandez-Megía, E., Novoa-Carballal, R., Quiñoá, E. y Riguera, R. (2005). Optimal routine conditions for the determination of the degree of acetylation of chitosan by ^1H -NMR. *Carbohydrate Polymers*, 61(2), 155-161.
- Flores, C., Lopez, M., Tabary, N., Neut, C., Chai, F., Betbeder, D., Herkt, C., Cazaux, F., Gaucher, V. y Martel, B. (2017). Preparation and characterization of novel chitosan and β -cyclodextrin polymer sponges for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers*, 173, 535-546.
- Focher, B., Beltrame, P., Naggi, A. y Torri, G. (1990). Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structure modifications. *Carbohydrate Polymers*, 12(4), 405-418.
- Fredlake, C. P., Crosthwaite, J. M., Hert, D. G., Aki, S. N. y Brennecke, J. F. (2004). Thermophysical properties of imidazolium-based ionic liquids. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 49(4), 954-964.
- Fung, Y.-c. (2013). *Biomechanics: mechanical properties of living tissues*. Springer Science & Business Media.

- Ghanaatian, E. y Entezam, M. (2019). Mechanical properties and drug release rate of poly (vinyl alcohol)/poly (ethylene glycol)/clay nanocomposite hydrogels: Correlation with structure and physical properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(32), 47843.
- Gomez-Serrano, V., Pastor-Villegas, J., Perez-Florindo, A., Duran-Valle, C. y Valenzuela-Calahorro, C. (1996). FT-IR study of rockrose and of char and activated carbon. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 36(1), 71-80.
- Gontrani, L. (2018). Choline-amino acid ionic liquids: past and recent achievements about the structure and properties of these really “green” chemicals. *Biophysical Reviews*, 10, 873-880.
- Grémare, A., Guduric, V., Bareille, R., Heroguez, V., Latour, S., L'heureux, N., Fricain, J. C., Catros, S. y Le Nihouannen, D. (2018). Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(4), 887-894.
- Guo, S., Zhao, K., Feng, Z., Hou, Y., Li, H., Zhao, J., Tian, Y. y Song, H. (2018). High performance liquid crystalline bionanocomposite ionogels prepared by in situ crosslinking of cellulose/halloysite nanotubes/ionic liquid dispersions and its application in supercapacitors. *Applied Surface Science*, 455, 599-607.
- Hamed, I., Özogul, F. y Regenstein, J. M. (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 40-50.
- Hanabusa, H., Izgorodina, E. I., Suzuki, S., Takeoka, Y., Rikukawa, M. y Yoshizawa-Fujita, M. (2018). Cellulose-dissolving protic ionic liquids as low cost catalysts for direct transesterification reactions of cellulose. *Green Chemistry*, 20(6), 1412-1422.
- Hao, Y.-H., Huang, Z., Ye, Q.-Q., Wang, J.-W., Yang, X.-Y., Fan, X.-Y., Li, Y.-L. y Peng, Y.-W. (2017). A comparison study on non-isothermal decomposition kinetics of chitosan with different analysis methods. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 128(2), 1077-1091.
- Heux, L., Brugnerotto, J., Desbrieres, J., Versali, M. F. y Rinaudo, M. (2000). Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromolecules*, 1(4), 746-751.
- Hirai, A., Odani, H. y Nakajima, A. (1991). Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy. *Polymer Bulletin*, 26(1), 87-94.
- Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 18-23.
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M. y Farahmandghavi, F. (2015). Fabrication of bio-nanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 44, 172-182.
- Hough, W. L., Smiglak, M., Rodríguez, H., Swatloski, R. P., Spear, S. K., Daly, D. T., Pernak, J., Grisel, J. E., Carliss, R. D. y Soutullo, M. D. (2007). The third evolution of ionic liquids: active pharmaceutical ingredients. *New Journal of Chemistry*, 31(8), 1429-1436.
- Huei, C. R. y Hwa, H.-D. (1996). Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane. *Carbohydrate Polymers*, 29(4), 353-358.

- Hull, D. y Clyne, T. W. (1996). *An introduction to composite materials*. Cambridge University Press.
- Iqbal, T., Sahrash, R., Siddiqa, A., Afsheen, S., Tahir, M., Khan, M., Riaz, K., Nabi, G., Fahad, M. y Sharif, M. (2019). Preparation and characterization of polyvinylidene fluoride/1-butyl-3-methylimidazolium bromide-based ionogel membranes for desalination applications. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1-12.
- Irani, M., Razavi, S. M., Abdel-Aal, E.-S. M., Hucl, P. y Patterson, C. A. (2019). Viscoelastic and textural properties of canary seed starch gels in comparison with wheat starch gel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 270-281.
- Isik, M., Gracia, R., Kollnus, L. C., Tomé, L. C., Marrucho, I. M. y Mecerreyes, D. (2013). Cholinium-based poly (ionic liquid) s: synthesis, characterization, and application as biocompatible ion gels and cellulose coatings. *ACS Macro Letters*, 2(11), 975-979.
- Isik, M., Sardon, H. y Mecerreyes, D. (2014). Ionic liquids and cellulose: dissolution, chemical modification and preparation of new cellulosic materials. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 11922-11940.
- IUPAC gold Book. (2007). PAC, 79, 1801. Definitions of terms relating to the structure and processing of sols, gels, networks, and inorganic-organic hybrid materials (IUPAC Recommendations 2007).
- Jo, S., Park, S., Oh, Y., Hong, J., Kim, H. J., Kim, K. J., Oh, K. K. y Lee, S. H. (2019). Development of Cellulose Hydrogel Microspheres for Lipase Immobilization. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 1-10.
- Kadokawa, J.-i., Endo, R., Hatanaka, D. y Yamamoto, K. (2015). Preparation of chitin nanofiber-reinforced cellulose films through stepwise regenerations from individually prepared ion gels. *Journal of Polymers and the Environment*, 23(3), 348-355.
- Kadokawa, J., Murakami, M. y Kaneko, Y. (2008). A facile preparation of gel materials from a solution of cellulose in ionic liquid. *Carbohydrate Research*, 343(4), 769-772.
- Kalia, S. y Choudhary, A. R. (2019). Synthesis and rheological studies of a novel composite hydrogel of xanthan, gellan and pullulan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, 475-482.
- Kalinoski, R. M. y Shi, J. (2019). Hydrogels derived from lignocellulosic compounds: Evaluation of the compositional, structural, mechanical and antimicrobial properties. *Industrial Crops and Products*, 128, 323-330.
- Kar, M., Tutusaus, O., MacFarlane, D. R. y Mohtadi, R. (2019). Novel and versatile room temperature ionic liquids for energy storage. *Energy & Environmental Science*, 12(2), 566-571.
- Kasaai, M. R. (2009). Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1667-1676.
- Kavanagh, G. M. y Ross-Murphy, S. B. (1998). Rheological characterisation of polymer gels. *Progress in Polymer Science*, 23(3), 533-562.
- Kawaguchi, K., Iijima, M., Miyakawa, H., Ohta, M., Muguruma, T., Endo, K., Nakazawa, F. y Mizoguchi, I. (2017). Effects of chitosan fiber addition on the properties of polyurethane with

- thermo-responsive shape memory. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 105(5), 1151-1156.
- Kimura, A., Nagasawa, N. y Taguchi, M. (2019). Synthesis of polysaccharide hybrid gel in ionic liquids via radiation-induced crosslinking. *Polymer Degradation and Stability*, 159, 133-138.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P. y Bohn, A. (2005). Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(22), 3358-3393.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K. y Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51-63.
- Kotov, N., Raus, V. y Dybal, J. (2019). Non-covalent interactions in bmimCl/co-solvent mixtures: A FTIR spectroscopy and computational study. *Journal of Molecular Liquids*, 285, 688-696.
- Kumar, M. N. V. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1-27.
- Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J. y Stepnowski, P. (2010). Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine Drugs*, 8(5), 1567-1636.
- Kurita, K. (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science*, 26(9), 1921-1971.
- Lavertu, M., Xia, Z., Serreqi, A. N., Berrada, M., Rodrigues, A., Wang, D., Buschmann, M. D. y Gupta, A. (2003). A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(6), 1149-1158.
- Le Bideau, J., Viau, L. y Vioux, A. (2011). Ionogels, ionic liquid based hybrid materials. *Chemical Society Reviews*, 40(2), 907-925.
- Lee, H.-Y., Kim, H.-E. y Jeong, S.-H. (2019). One-pot synthesis of silane-modified hyaluronic acid hydrogels for effective antibacterial drug delivery via sol-gel stabilization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174, 308-315.
- Li, G. y Zhu, F. (2018). Rheological properties in relation to molecular structure of quinoa starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 767-775.
- Li, J., Osada, Y. y Cooper-White, J. (2018a). *Functional Hydrogels as Biomaterials* (Vol. 12). Springer.
- Li, W., Gao, F., Kan, J., Deng, J., Wang, B. y Hao, S. (2019a). Synthesis and fabrication of a keratin-conjugated insulin hydrogel for the enhancement of wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 175, 436-444.
- Li, Y., Wang, J., Liu, X. y Zhang, S. (2018b). Towards a molecular understanding of cellulose dissolution in ionic liquids: anion/cation effect, synergistic mechanism and physicochemical aspects. *Chemical Science*, 9(17), 4027-4043.
- Li, Z., Wang, J., Hu, R., Lv, C. y Zheng, J. (2019b). A Highly Ionic Conductive, Healable, and Adhesive Polysiloxane-Supported Ionogel. *Macromolecular Rapid Communications*, 1800776.
- Liu, E., Li, M., Das, L., Pu, Y., Frazier, T., Zhao, B., Crocker, M., Ragauskas, A. J. y Shi, J. (2018). Understanding Lignin Fractionation and Characterization from Engineered Switchgrass

- Treated by an Aqueous Ionic Liquid. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(5), 6612-6623.
- Liu, H. y Yu, H. (2018). Ionic liquids for electrochemical energy storage devices applications. *Journal of Materials Science & Technology*, 35(4), 674-686.
- Liu, Q.-P., Hou, X.-D., Li, N. y Zong, M.-H. (2012). Ionic liquids from renewable biomaterials: synthesis, characterization and application in the pretreatment of biomass. *Green Chemistry*, 14(2), 304-307.
- López, F., Mercê, A., Alguacil, F. y López-Delgado, A. (2008). A kinetic study on the thermal behaviour of chitosan. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 91(2), 633-639.
- Markstedt, K., Sundberg, J. y Gatenholm, P. (2014). 3d bioprinting of cellulose structures from an ionic liquid. *3D Printing and Additive Manufacturing*, 1(3), 115-121.
- Marr, P. C. y Marr, A. C. (2016). Ionic liquid gel materials: applications in green and sustainable chemistry. *Green Chemistry*, 18(1), 105-128.
- Martínez-Camacho, A., Cortez-Rocha, M., Ezquerro-Brauer, J., Graciano-Verdugo, A., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M., Yépez-Gómez, M. y Plascencia-Jatomea, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 305-315.
- Mehta, M. J. y Kumar, A. (2019a). Ionic Liquid Assisted Gelatin Films: A Greener UV Shielding, Antioxidant and Antibacterial Food Packaging Material. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7, 8631-8636.
- Mehta, M. J. y Kumar, A. (2019b). Ionic Liquid Stabilized Gelatin-Lignin Films: A Potential UV-Shielding Material with Excellent Mechanical and Antimicrobial Properties. *Chemistry-A European Journal*, 25(5), 1269-1274.
- Methacanon, P., Prasitsilp, M., Pothsree, T. y Pattaraarchachai, J. (2003). Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Polymers*, 52(2), 119-123.
- Mezger, T. G. (2006). *The rheology handbook: for users of rotational and oscillatory rheometers*. Vincentz Network GmbH & Co KG.
- Mohd, N., Draman, S., Salleh, M. y Yusof, N. (2017). *Dissolution of cellulose in ionic liquid: A review*. Artículo presentado para su publicación en 6th International Advances in Applied Physics & Materials Science Congress & Exhibition (1-3 Junio de 2016 en Estambul, Turquía).
- Monteiro, R. C., do Sul, J. A. I. y Costa, M. F. (2018). Plastic pollution in islands of the Atlantic Ocean. *Environmental Pollution*, 238, 103-110.
- Moussout, H., Ahlafi, H., Aazza, M. y Bourakhouadar, M. (2016). Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis. *Polymer Degradation and Stability*, 130, 1-9.
- Muxika, A., Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P. y De La Caba, K. (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1358-1368.
- Muzzarelli, R. A. A. y Peter, M. G. (1997). *Chitin Handbook*. Atec, Italia.

- Muzzarelli, R. A. A. y Rocchetti, R. (1985). Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 5(6), 461-472.
- Nagahama, H., Nwe, N., Jayakumar, R., Koiwa, S., Furuike, T. y Tamura, H. (2008). Novel biodegradable chitin membranes for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, 73(2), 295-302.
- Nam, Y. S., Park, W. H., Ihm, D. y Hudson, S. M. (2010). Effect of the degree of deacetylation on the thermal decomposition of chitin and chitosan nanofibers. *Carbohydrate Polymers*, 80(1), 291-295.
- Nanjo, F., Katsumi, R. y Sakai, K. (1991). Enzymatic method for determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Analytical Biochemistry*, 193(2), 164-167.
- Nevstrueva, D., Murashko, K., Vunder, V., Aabloo, A., Pihlajamäki, A., Mänttari, M., Pyrhönen, J., Koironen, T. y Torop, J. (2018). Natural cellulose ionogels for soft artificial muscles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 161, 244-251.
- Niola, F., Basora, N., Chornet, E. y Vidal, P. (1993). A rapid method for the determination of the degree of N-acetylation of chitin-chitosan samples by acid hydrolysis and HPLC. *Carbohydrate Research*, 238, 1-9.
- Osada, Y. y Khokhlov, A. (2001). *Polymer gels and networks*. CRC Press.
- Ottey, M. H., Vårum, K. M. y Smidsrød, O. (1996). Compositional heterogeneity of heterogeneously deacetylated chitosans. *Carbohydrate Polymers*, 29(1), 17-24.
- Pawlak, A. y Mucha, M. (2003). Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. *Thermochimica Acta*, 396(1), 153-166.
- Peng, H., Ning, X., Wang, S. y Ju, A. (2018a). The self-assembly and formation mechanism of a novel cellulose gel with chiral nematic structure. *Cellulose*, 25(10), 5499-5510.
- Peng, H., Wang, S., Xu, H. y Dai, G. (2018b). Preparations, properties, and formation mechanism of novel cellulose hydrogel membrane based on ionic liquid. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(7), 45488.
- Peniche, C., Argüelles-Monal, W. y Goycoolea, F. (2008). Chitin and chitosan: major sources, properties and applications. *Monomers, polymers and composites from renewable resources* (Vol. 1, pp. 517-542). M. Belgacem & A. Gandini (Ed.). Elsevier Ltd.
- Picout, D. R. y Ross-Murphy, S. B. (2003). Rheology of biopolymer solutions and gels. *The Scientific World Journal*, 3, 105-121.
- Pinho, E. D., Martins, A., Araújo, J. V., Reis, R. L. y Neves, N. M. (2014). Size also matters in biodegradable composite microfiber reinforced by chitosan nanofibers. *MRS Online Proceedings Library Archive*, 1621, 59-69.
- Pinkert, A., Marsh, K. N., Pang, S. y Staiger, M. P. (2009). Ionic liquids and their interaction with cellulose. *Chemical Reviews*, 109(12), 6712-6728.
- Poonguzhali, R., Basha, S. K. y Kumari, V. S. (2017). Synthesis and characterization of chitosan-PVP-nanocellulose composites for in-vitro wound dressing application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 111-120.

- Prasad, K., Mondal, D., Sharma, M., Freire, M. G., Mukesh, C. y Bhatt, J. (2018). Stimuli responsive ion gels based on polysaccharides and other polymers prepared using ionic liquids and deep eutectic solvents. *Carbohydrate Polymers*, 180, 328-336.
- Prasad, K., Murakami, M., Kaneko, Y., Takada, A., Nakamura, Y. y Kadokawa, J. (2009). Weak gel of chitin with ionic liquid, 1-allyl-3-methylimidazolium bromide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(3), 221-225.
- Quah, S. P., Smith, A. J., Preston, A. N., Laughlin, S. T. y Bhatia, S. R. (2018). Large-area alginate/PEO-PPO-PEO hydrogels with thermoreversible rheology at physiological temperatures. *Polymer*, 135, 171-177.
- Ranjan, R., Rawat, K. y Bohidar, H. (2017). Folic acid supramolecular ionogels. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(34), 22934-22945.
- Ray, T. R., Choi, J., Bandodkar, A. J., Krishnan, S., Gutruf, P., Tian, L., Ghaffari, R. y Rogers, J. A. (2019). Bio-integrated wearable systems: a comprehensive review. *Chemical Reviews*, 119(8), 5461-5533.
- Raymond, L., Morin, F. y Marchessault, R. (1993). Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. *Carbohydrate Research*, 246(1), 331-336.
- Rigual, V., Santos, T. M., Domínguez, J. C., Alonso, M. V., Oliet, M. y Rodríguez, F. (2017). Recovery and Reuse of 1-Allyl-3-methylimidazolium Chloride in the Fractionation of *Pinus radiata* Wood. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(3), 2384-2392.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632.
- Rizzo, C., Andrews, J. L., Steed, J. W. y D'Anna, F. (2019a). Carbohydrate-supramolecular gels: Adsorbents for chromium (VI) removal from wastewater. *Journal of Colloid and Interface Science*, 548, 184-196.
- Rizzo, C., Mandoli, A., Marullo, S. y D'Anna, F. (2019b). Ionic Liquid Gels: Supramolecular Reaction Media for the Alcoholysis of Anhydrides. *The Journal of Organic Chemistry*, 84(10), 6356-6365.
- Roberts, G. A. F. (1992). *Chitin chemistry*. Macmillan Press, London.
- Rojas, O. J. (2016). *Cellulose chemistry and properties: Fibers, nanocelluloses and advanced materials* (Vol. 271). Springer.
- Ross-Murphy, S. B. (1995). Structure–property relationships in food biopolymer gels and solutions. *Journal of Rheology*, 39(6), 1451-1463.
- Ross-Murphy, S. B. (1998). Reversible and irreversible biopolymer gels—structure and mechanical properties. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 102(11), 1534-1539.
- Sabnis, S. y Block, L. H. (1997). Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N-deacetylation of chitosan. *Polymer Bulletin*, 39(1), 67-71.
- Scarpellini, E., Ortolani, M., Nucara, A., Baldassarre, L., Missori, M., Fastampa, R. y Caminiti, R. (2016). Stabilization of the tensile strength of aged cellulose paper by cholinium-amino acid ionic liquid treatment. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(42), 24088-24097.

- Sharma, A., Rawat, K., R Solanki, P. y Bohidar, H. (2015a). Gelatin-ionic liquid based platform for glucose detection. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(13), 1257-1267.
- Sharma, A., Rawat, K., Solanki, P. R., Aswal, V., Kohlbrecher, J. y Bohidar, H. (2015b). Internal structure and thermo-viscoelastic properties of agar ionogels. *Carbohydrate Polymers*, 134, 617-626.
- Simões, D., Miguel, S. P., Ribeiro, M. P., Coutinho, P., Mendonça, A. G. y Correia, I. J. (2018). Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 127, 130-141.
- Singh, J., Dutta, P., Dutta, J., Hunt, A., Macquarrie, D. y Clark, J. (2009). Preparation and properties of highly soluble chitosan-l-glutamic acid aerogel derivative. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 188-195.
- Sippel, P., Dietrich, V., Reuter, D., Aumüller, M., Lunkenheimer, P., Loidl, A. y Krohns, S. (2016). Impact of water on the charge transport of a glass-forming ionic liquid. *Journal of Molecular Liquids*, 223, 635-642.
- Slavutsky, A. M. y Bertuzzi, M. A. (2019). Formulation and characterization of hydrogel based on pectin and brea gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 784-791.
- Smith, C. J., Wagle, D. V., O'Neill, H. M., Evans, B. R., Baker, S. N. y Baker, G. A. (2017a). Bacterial cellulose ionogels as chemosensory supports. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(43), 38042-38051.
- Smith, C. J., Wagle, D. V., O'Neill, H. M., Evans, B. R., Baker, S. N. y Baker, G. A. (2017b). Multi-Purpose Cellulosic Ionogels. *Ionic Liquids: Current State and Future Directions* (pp. 143-155). ACS Publications.
- Song, H., Luo, Z., Zhao, H., Luo, S., Wu, X., Gao, J. y Wang, Z. (2013). High tensile strength and high ionic conductivity bionanocomposite ionogels prepared by gelation of cellulose/ionic liquid solutions with nano-silica. *Rsc Advances*, 3(29), 11665-11675.
- Souza, R., Faria, E., Figueiredo, R., Mettedi, S., Santos, O., Lima, A. y Soares, C. (2017). Protic ionic liquid applied to enhance the immobilization of lipase in sol-gel matrices. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 128(2), 833-840.
- Sperling, L. H. (2005). *Introduction to physical polymer science* (4 ed.). John Wiley & Sons.
- Subramanian, R. y Gunasekaran, S. (1997). Small amplitude oscillatory shear studies on Mozzarella cheese Part I. Region of linear viscoelasticity. *Journal of Texture Studies*, 28(6), 633-642.
- Swatloski, R. P., Spear, S. K., Holbrey, J. D. y Rogers, R. D. (2002). Dissolution of cellose with ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 124(18), 4974-4975.
- Takada, A. y Kadokawa, J.-i. (2015). Fabrication and characterization of polysaccharide ion gels with ionic liquids and their further conversion into value-added sustainable materials. *Biomolecules*, 5(1), 244-262.
- Tan, S. C., Khor, E., Tan, T. K. y Wong, S. M. (1998). The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta*, 45(4), 713-719.

- Tang, H., Cai, D., Ren, T., Xiong, P., Liu, Y., Gu, H. y Shi, G. (2019). Fabrication of a low background signal glucose biosensor with 3D network materials as the electrocatalyst. *Analytical Biochemistry*, 567, 63-71.
- Tao, D.-J., Cheng, Z., Chen, F.-F., Li, Z.-M., Hu, N. y Chen, X.-S. (2013). Synthesis and thermophysical properties of biocompatible cholinium-based amino acid ionic liquids. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 58(6), 1542-1548.
- Tarannum, A., Rao, J. R. y Fathima, N. N. (2018). Choline-based amino acid ILS-collagen interaction: enunciating its role in stabilization/destabilization phenomena. *The Journal of Physical Chemistry B*, 122(3), 1145-1151.
- Thiemann, S., Sachnov, S. J., Pettersson, F., Bollström, R., Österbacka, R., Wasserscheid, P. y Zaumseil, J. (2014). Cellulose-based ionogels for paper electronics. *Advanced Functional Materials*, 24(5), 625-634.
- Tomasini, C. y Castellucci, N. (2013). Peptides and peptidomimetics that behave as low molecular weight gelators. *Chemical Society Reviews*, 42(1), 156-172.
- Trache, D., Hussin, M. H., Chuin, C. T. H., Sabar, S., Fazita, M. R. N., Taiwo, O. F. A., Hassan, T. M. y Haafiz, M. K. M. (2016). Microcrystalline cellulose: Isolation, characterization and bio-composites application – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93(Part A), 789-804.
- Tran, C., Duri, S. y Harkins, A. L. (2013). Recyclable synthesis, characterization, and antimicrobial activity of chitosan-based polysaccharide composite materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101(8), 2248-2257.
- Trivedi, T. J., Rao, K. S. y Kumar, A. (2014). Facile preparation of agarose-chitosan hybrid materials and nanocomposite ionogels using an ionic liquid via dissolution, regeneration and sol-gel transition. *Green Chemistry*, 16(1), 320-330.
- Tu, C., Zhang, R.-d., Yan, C., Guo, Y. y Cui, L. (2019). A pH indicating carboxymethyl cellulose/chitosan sponge for visual monitoring of wound healing. *Cellulose*, 26(7), 4541-4552.
- Ummartyotin, S. y Manuspiya, H. (2015). A critical review on cellulose: from fundamental to an approach on sensor technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 402-412.
- Vekariya, R. L. (2017). A review of ionic liquids: Applications towards catalytic organic transformations. *Journal of Molecular Liquids*, 227, 44-60.
- Viau, L., Tourné-Péteilh, C., Devoisselle, J.-M. y Vioux, A. (2010). Ionogels as drug delivery system: one-step sol-gel synthesis using imidazolium ibuprofenate ionic liquid. *Chemical Communications*, 46(2), 228-230.
- Vioux, A., Viau, L., Volland, S. y Le Bideau, J. (2010). Use of ionic liquids in sol-gel; ionogels and applications. *Comptes Rendus Chimie*, 13(1), 242-255.
- Voroshylava, I. V., Ferreira, E. S., Malček, M., Costa, R., Pereira, C. M. y Cordeiro, M. N. D. (2018). Influence of the anion on the properties of ionic liquid mixtures: a molecular dynamics study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(21), 14899-14918.

- Wang, B., Qin, L., Mu, T., Xue, Z. y Gao, G. (2017a). Are ionic liquids chemically stable? *Chemical Reviews*, 117(10), 7113-7131.
- Wang, F., Zhang, S., Zhang, Y., Lin, Q., Chen, Y., Zhu, D., Sun, L. y Chen, T. (2019). Facile Fabrication of a Self-Healing Temperature-Sensitive Sensor Based on Ionogels and Its Application in Detection Human Breath. *Nanomaterials*, 9(3), 343.
- Wang, J., Hao, S., Luo, T., Cheng, Z., Li, W., Gao, F., Guo, T., Gong, Y. y Wang, B. (2017b). Feather keratin hydrogel for wound repair: preparation, healing effect and biocompatibility evaluation. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 149, 341-350.
- Wang, Q., Sun, J., Yao, Q., Ji, C., Liu, J. y Zhu, Q. (2018). 3D printing with cellulose materials. *Cellulose*, 25(8), 4275-4301.
- Wang, W., Bo, S., Li, S. y Qin, W. (1991). Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13(5), 281-285.
- Wanjun, T., Cunxin, W. y Donghua, C. (2005). Kinetic studies on the pyrolysis of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, 87(3), 389-394.
- Welton, T. (2018). Ionic liquids: a brief history. *Biophysical Reviews*, 10(3), 691-706.
- Xu, J., Tan, X., Chen, L., Li, X. y Xie, F. (2019). Starch/microcrystalline cellulose hybrid gels as gastric-floating drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers*, 215, 151-159.
- Yadav, M., Goswami, P., Paritosh, K., Kumar, M., Pareek, N. y Vivekanand, V. (2019). Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(1), 8.
- Yavir, K., Marcinkowski, Ł., Marcinkowska, R., Namieśnik, J. y Kloskowski, A. (2018). Analytical applications and physicochemical properties of ionic liquid-based hybrid materials: A review. *Analytica Chimica Acta*, 1054, 1-16.
- Ye, X., Li, X., Shen, Y., Chang, G., Yang, J. y Gu, Z. (2017). Self-healing pH-sensitive cytosine-and guanosine-modified hyaluronic acid hydrogels via hydrogen bonding. *Polymer*, 108, 348-360.
- Yen, M.-T., Yang, J.-H. y Mau, J.-L. (2009). Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 75(1), 15-21.
- Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Chaabouni, M., Rinaudo, M., Souard, F., Vanhaverbeke, C., Jellouli, K. y Nasri, M. (2014). Use of a fractional factorial design to study the effects of experimental factors on the chitin deacetylation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 385-390.
- Yu, Q., Wu, Y., Li, D., Cai, M., Zhou, F. y Liu, W. (2017). Supramolecular ionogel lubricants with imidazolium-based ionic liquids bearing the urea group as gelator. *Journal of Colloid and Interface Science*, 487, 130-140.
- Zamfir, L.-G., Rotariu, L. y Bala, C. (2013). Acetylcholinesterase biosensor for carbamate drugs based on tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane/ionic liquid conductive gels. *Biosensors and Bioelectronics*, 46, 61-67.

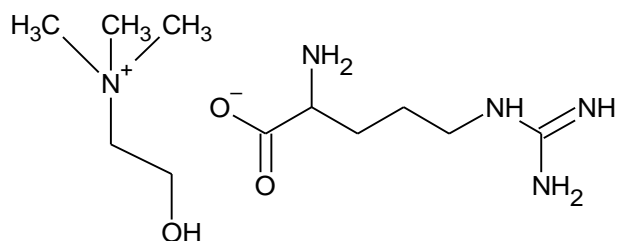
- Zargar, V., Asghari, M. y Dashti, A. (2015). A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *ChemBioEng Reviews*, 2(3), 204-226.
- Zawadzki, J. y Kaczmarek, H. (2010). Thermal treatment of chitosan in various conditions. *Carbohydrate Polymers*, 80(2), 394-400.
- Zhang, H. y Neau, S. H. (2001). In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 22(12), 1653-1658.
- Zhang, J., Wu, J., Yu, J., Zhang, X., He, J. y Zhang, J. (2017). Application of ionic liquids for dissolving cellulose and fabricating cellulose-based materials: state of the art and future trends. *Materials Chemistry Frontiers*, 1(7), 1273-1290.
- Zhang, L. M., He, Y., Cheng, S., Sheng, H., Dai, K., Zheng, W. J., Wang, M. X., Chen, Z. S., Chen, Y. M. y Suo, Z. (2019). Self-Healing, Adhesive, and Highly Stretchable Ionogel as a Strain Sensor for Extremely Large Deformation. *Small*, 15(21), 1804651.
- Zhang, S., Ma, L., Wen, P., Ye, X., Dong, R., Sun, W., Fan, M., Yang, D., Zhou, F. y Liu, W. (2018). The ecotoxicity and tribological properties of choline amino acid ionic liquid lubricants. *Tribology International*, 121, 435-441.
- Zhang, Y., Xue, C., Xue, Y., Gao, R. y Zhang, X. (2005). Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate Research*, 340(11), 1914-1917.
- Zhao, T., Chen, Z., Lin, X., Ren, Z., Li, B. y Zhang, Y. (2018). Preparation and characterization of microcrystalline cellulose (MCC) from tea waste. *Carbohydrate Polymers*, 184, 164-170.
- Zheng, X., Huang, F., Chen, L., Huang, L., Cao, S. y Ma, X. (2019). Preparation of transparent film via cellulose regeneration: Correlations between ionic liquid and film properties. *Carbohydrate Polymers*, 203, 214-218.
- Zhu, M., Wu, J., Wang, Y., Song, M., Long, L., Siyal, S. H., Yang, X. y Sui, G. (2018). Recent advances in gel polymer electrolyte for high-performance lithium batteries. *Journal of Energy Chemistry*, 37, 126-142.
- Zhu, S., Wu, Y., Chen, Q., Yu, Z., Wang, C., Jin, S., Ding, Y. y Wu, G. (2006). Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. *Green Chemistry*, 8(4), 325-327.

Anexo I
**Estructuras químicas de los líquidos
iónicos ChAAIL utilizados en el *screening***

Anexo I. Estructuras químicas de los líquidos iónicos ChAAIL utilizados en el *screening*

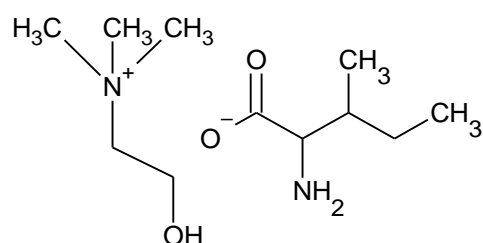
ChArg

Arginato de colina



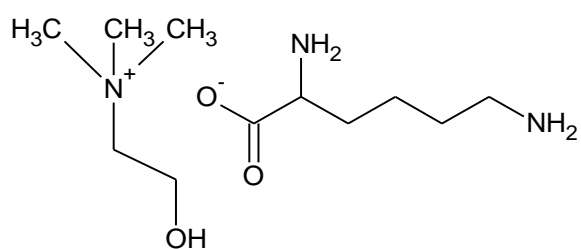
ChIsol

Isolucinato de colina



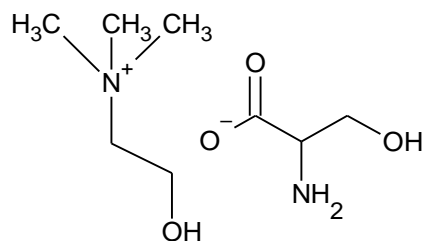
ChLys

Lisinato de colina



ChSer

Serinato de colina



Anexo II

Publicaciones

PUBLICACIÓN I

**“Thermal and kinetics of the degradation of
chitosan with different deacetylation degrees
under oxidizing atmosphere”**

M. Mar Villar-Chavero, Juan C. Domínguez, M. Virginia Alonso,
Mercedes Oliet y Francisco Rodríguez

Thermochimica Acta, 2018, 670, 18-26





Thermal and kinetics of the degradation of chitosan with different deacetylation degrees under oxidizing atmosphere

M. Mar Villar-Chavero*, Juan C. Domínguez, M. Virginia Alonso, Mercedes Oliet, Francisco Rodriguez

Chemical Engineering and Materials Department, Complutense University of Madrid, Av. Complutense S/N, 28040, Madrid, Spain



ARTICLE INFO

Keywords:

Chitosan
Deacetylation degree
Thermal stability
Isoconversional method
DAEM model

ABSTRACT

The degradation process of chitosan with degrees of deacetylation (DD) varying from 54 to 84% was investigated by thermogravimetric analysis at different heating rates under air atmosphere. The chitosan with DD of 54% presented the highest thermal stability and slower changes in its structure as the temperature was increased, according to the infrared spectroscopy analyses.

The activation energies (E_a) of the degradation process were estimated by the Flynn-Wall-Ozawa and the Vyazovkin isoconversional methods, obtaining values between 90 and 319 kJ/mol. The 3R-Gaussian distributed activation energy (3R-Gaussian DAEM) model was applied and adjusted successfully to the experimental data. In addition, DAEM model allowed to determine the E_a associated to each degradation reaction stage of chitosan (between 163–346.3 kJ/mol), in contrast to isoconversional methods. Consequently, the 3R-Gaussian DAEM model is a suitable option to describe the kinetics of chitosan degradation process.

1. Introduction

Chitosan is a polysaccharide used in many fields, such as cosmetic industry, water engineering, food industry, pharmacy, and medicine due to its physico-chemical and biological good properties: antioxidant, adsorption enhancer, anticholesterolemic, antimicrobial, analgesic, hemostatic, etc. [1–3]. This polysaccharide is a lineal copolymer of β -(1-4) linked 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose or *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) and 2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose or D-glucosamine (Glc); and it is obtained by deacetylation of chitin [4]. Chitin is easily accessible since it comes, principally, from wastes of seafood processing industries [5].

One of the most important parameters for establishing the physico-chemical identity of chitosan is the degree of deacetylation (DD), which is defined as the molar fraction of the units D-glucosamine presents in the polymeric chain. When the DD is above 50%, the polymer is called chitosan, and when the DD is below of this percentage, it is known as chitin [6]. Therefore, chitosan with different DD has varying physico-chemical properties [4,7,8].

The study of the thermal degradation of chitosan is very useful to establish its thermal stability, to understand the structural changes and to determine the reactions that take place during this process. This

knowledge is of great importance in order to define the applications of chitosan [9]. In this line, the thermal degradation of chitosan is relevant for the design and planning of the industrial processes to which chitosan is exposed to obtain, for instance, membranes, drugs, flocculants, reinforcement chemical or physical, etc. [9–14].

Several authors have studied the pyrolysis of chitosan with different degrees of deacetylation by using thermogravimetric analysis [11,15–17]. These studies concluded that the pyrolysis of chitosan occurs in two steps. The first one is due to the deacetylation and depolymerization processes, while the second one is related to the residual decomposition reactions produced in inert conditions. Furthermore, in terms of kinetics of the degradation process, these authors reported that the activation energies (E_a) estimated for chitosans with lower DD are greater than for chitosans with higher DD, i.e. in the latter case chitosans are less thermally stable [18–20]. However, there is little studies about the kinetics and thermal properties of the thermal degradation of chitosan as a function of DD in oxidizing atmosphere.

The present work aims to investigate the effect of the DD of chitosan on its thermal stability under air atmosphere, as well as comparing the obtained kinetic parameters of the degradation processes of chitosan by isoconversional methods and a multi-reaction distributed activation energy (DAEM) model. For this purpose, chitosans with different DD

* Corresponding author at: Chemical Engineering and Materials Department, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Av. Complutense S/N, 28040, Madrid, Spain.

E-mail address: mdm.villar@ucm.es (M.M. Villar-Chavero).

<https://doi.org/10.1016/j.tca.2018.10.004>

Received 10 July 2018; Received in revised form 28 September 2018; Accepted 5 October 2018

Available online 09 October 2018

0040-6031/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

(between 54–84%) were obtained from chitin through a deacetylation process. Fourier Transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to establish the DD of the produced chitosans and study the changes in their chemical structure during the thermal degradation process. The experimental data of the degradation process were obtained by thermogravimetric analysis (TGA). To determine the crystallinity of the samples X-Ray Diffraction (XRD) was utilized. The Flynn-Wall-Ozawa (FWO) and Vyazovkin (VYA) isoconversional methods were used to estimate the activation energies as a function of the conversion of the thermal degradation of chitosans. A multi-reaction DAEM model of three reaction stages was proposed in order to model the behavior during the degradation process, as well as to determine the kinetic parameters of each reaction stage.

2. Kinetic study: Theory

Generally, chemical reactions of the degradation processes are described by a single step kinetic equation [21], Eqs. (1) and (2):

$$d\alpha/dt = k(T) \cdot f(\alpha) \quad (1)$$

$$\alpha(t) = \frac{w_0 - w_t}{w_0 - w_f} \quad (2)$$

where t is time; $\alpha(t)$ is the conversion, defined as the ratio between the instant mass loss and the total mass loss; w_0 and w_f are the initial and final masses of the sample, respectively; w_t is the mass at time t ; $f(\alpha)$ is the process mechanism function; and $k(T)$ is the rate constant, usually assumed to follow an Arrhenius equation, Eq. (3):

$$k(T) = k_0 \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T}\right) \quad (3)$$

where k_0 is the pre-exponential factor, E_a is the activation energy, T is the absolute temperature, and R is the universal gas constant.

2.1. Isoconversional methods

One of the major problems in kinetic study is the knowledge of the kinetic model due to several decomposition reactions that take place during a degradation process. For this reason, isoconversional methods, also called model-free kinetics methods, are widely used because they do not assume a kinetic model [21]. In this work, two isoconversional methods were employed: the Flynn-Wall-Ozawa [22,23] and Vyazovkin methods [24–26]. Henceforth, these methods will be referred FWO and VYA, respectively. The FWO method is described by Eq. (4):

$$\ln(\beta) = A - 1.052 \frac{E_a}{R \cdot T_\alpha} \quad (4)$$

where β is the heating rate, A is a constant and T_α is the temperature at a certain conversion. This method is one of the most frequently used in the literature to determine activation energies of degradation processes of chitosan and their derivatives [11,13,16,27].

The VYA method is more accurate due to directly performing numerical integration [21] by minimizing the Eq. (5):

$$\Phi(E_a) = \sum_{i=1}^n \sum_{j \neq i}^n \frac{I(E_a, T_{\alpha,i}) \beta_j}{I(E_a, T_{\alpha,j}) \beta_i} \quad (5)$$

in which $I(E_a, T_\alpha)$, the temperature integral, is defined by Eq. (6):

$$I(E_a, T_\alpha) = \int_{T_{\alpha-\Delta\alpha}}^{T_\alpha} \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T}\right) dT \quad (6)$$

The temperature integral is calculated to obtain the activation energy at each given value of conversion.

2.2. DAEM model

Another way to address the kinetic study of degradation processes is the DAEM model. This model is an alternative to isoconversional methods and it is found in the literature to describe the kinetics of degradation of different biopolymers, including chitosan and chitin [14]. The DAEM model assumes that the degradation process occurs in several independent and parallel n^{th} order reactions [28,29]. It is described by Eq. (7), when the reaction order is 1 and the process is non-isothermal:

$$\alpha(T) = \int_0^\infty \left\{ 1 - \exp\left[-\frac{k_0}{\beta} \int_0^T \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T}\right) dT\right] \right\} f(E_a) dE_a \quad (7)$$

Due to that each reaction has a different activation energy, the degradation process presents a distribution of activation energies, $f(E_a)$, usually described by a continuous distribution function. The Gaussian distribution is one of the most commonly used [30], which is indicated in Eq. (8):

$$f(E_a) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(E_a - E_{a0})^2}{2\sigma^2}\right] \quad (8)$$

where E_{a0} is the mean activation energy, and σ is the standard deviation of the Gaussian distribution.

A natural sample may contain several components or can be described by pseudocomponents [31,32]. In this case, a multi-reaction DAEM model can be applied to total conversion generally as a linear combination of the degradation of the individual components (or pseudocomponents), described by Eq. (9):

$$\alpha(T) = \sum_{j=1}^n c_j \alpha_j(T) / \sum_{j=1}^n c_j \quad (9)$$

where c_j is the fraction of each component of the sample that is reacting, $\alpha_j(T)$ is the conversion for each component of the sample, and n is the number of individual components of the sample.

3. Materials and methods

3.1. Materials and reagents

Chitin powder from Alaska snow crab shells was purchased from G.T.C. Bio Corporation (China) and it was used without any further purification. Sodium hydroxide pellets and potassium bromide were acquired from Panreac Applichem.

3.2. Deacetylation of the chitin and determination of the degree of deacetylation

Chitin was mixed with different NaOH solutions (10 g per 300 mL of alkali solution). Concentrations of 37.1, 37.9, 39.3, 45 and 52% of NaOH were used to obtain chitosan with different DD. The deacetylation processes were carried out in a 500 mL flat bottom flask for 3 h at 105 °C, under stirring at 900 rpm. After filtration, obtained chitosans were washed until neutral pH and dried in an oven for 3 h at 100 °C. The samples were milled in a MM301 Retsch ball mill and sieved (particle size < 180 μm) in order to obtain homogenized ones.

The DD of chitin was 5.2%, determined according to Ottey, Vårum and Smidsrød [33] and Raymond, Morin and Marchessault [34] using ¹³C CP/MAS NMR spectroscopy (Fig. S.1). Conversely, the DD of obtained chitosans were determined by Fourier Transform infrared spectroscopy (FTIR). FTIR spectra were recorded with a FT/IR-4600 Jasco spectrophotometer using the KBr method. The pellet was prepared from a mixture of sample and KBr (1:100 ratio). The spectra were acquired by accumulation of 64 scans and a wavenumber range of 4000–400 cm⁻¹, with a resolution of 2 cm⁻¹. The DD was calculated applying Eq. (10),

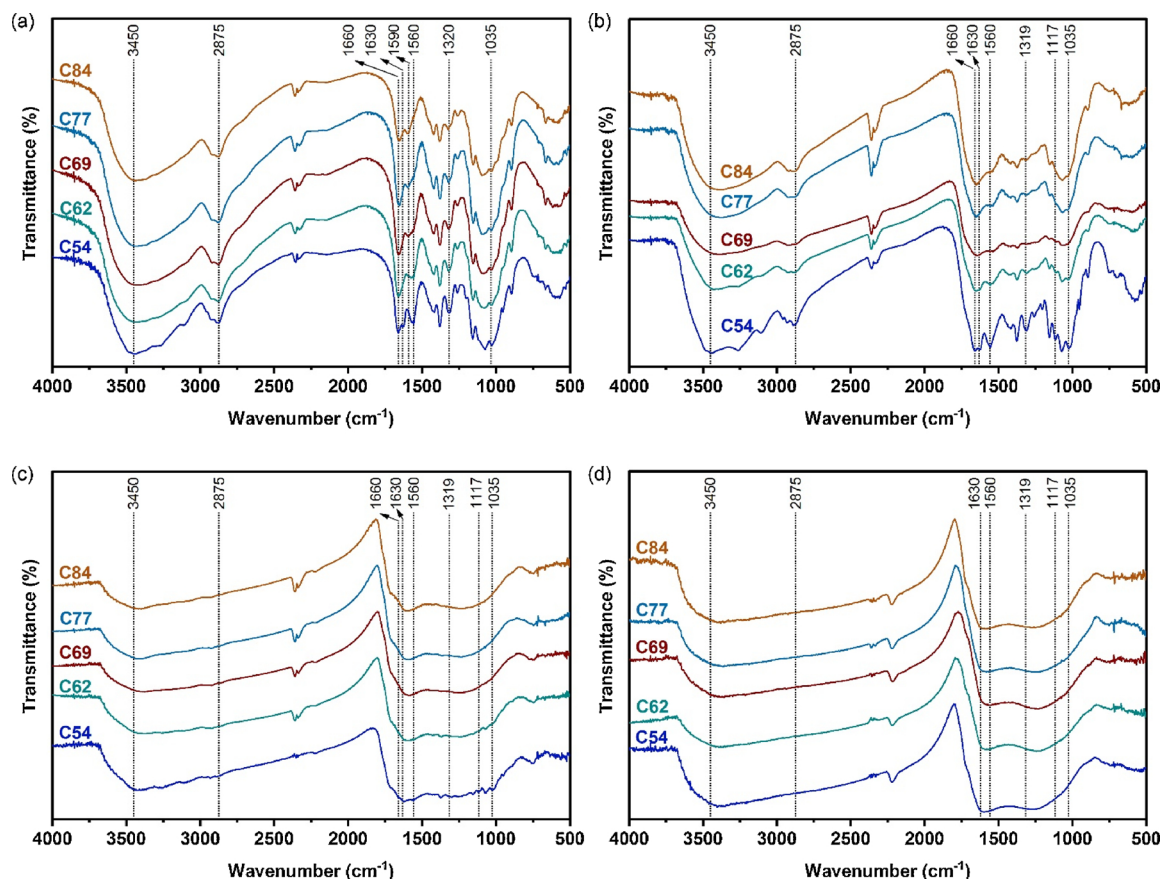


Fig. 1. FTIR spectra of C54, C62, C69, C77, and C84 at room temperature (a), 290 (b), 340 (c), and 500 °C (d).

proposed by Brugnerotto, Lizardi, Goycoolea, Argüelles-Monal, Desbrieres and Rinaudo [35], in which A_{1320}/A_{1420} represents the ratio of absorbance of the bands 1320 and 1420 cm^{-1} , respectively.

$$A_{1320}/A_{1420} = 0.3822 + 0.03133 \cdot DD \quad (10)$$

3.3. Structural changes during the process of chitosan degradation

FTIR spectroscopy was also employed to determine the changes in the chemical structure of the chitosans during their thermal degradations. First, the chitosan samples were degraded in a Mettler-Toledo TGA/STDA 851° under air atmosphere (flow rate of 20 mL/min) using temperature profiles that started from 30 °C and reached 290, 340, and 500 °C at a heating rate of 10 °C/min. After the degradation, the samples were stored in a desiccator for 15 min at room temperature. The KBr method was applied under the same conditions of preparation and measure than in the determination of DD of chitosans.

3.4. Determination of the crystallinity of chitosans

The crystallinity of the obtained chitosans, as well as the chitin raw material, was evaluate in order to determine the percentage of the crystalline part (CrI) of the biopolymers. For that purpose, a Philips X'Pert MDP X-Ray diffractometer was used with Cu-K α radiation at 45 kV and 40 mA, and the relative intensity was recorded in the scattering range (2θ) between 2 and 40° with a speed 0.6°/min. CrI was calculated according to Eq. (11) proposed by Focher, Beltranme, Naggi and Torri [36]:

$$CrI = (I_{110} - I_{am}) \cdot 100 / I_{110} \quad (11)$$

where I_{110} is the maximum intensity of the 110 lattice diffraction (at $2\theta \approx 20^\circ$), and I_{am} is the intensity of amorphous diffraction in the same

units than I_{110} (at $2\theta \approx 16^\circ$).

3.5. Evaluation of the thermal stability of the chitosans

The thermogravimetric measurements were carried out in the TGA instrument under air atmosphere (flow rate of 20 mL/min). The analyses were performed in alumina crucibles (70 μL) and the weight of the sample was between 8 and 11 mg. All samples were heated from 30 to 950 °C at heating rates of 6, 8, 10, 12 and 14 °C/min. Thermal stability was defined as the temperature at 25% of conversion on dry basis ($T_{25\%}$). Three samples were measured at each heating rate.

3.6. Determination of the kinetic parameters of the degradation process

The data of TGA analyses were treated with Matlab R2014b software to obtain the activation energies of the degradation process of chitosan by FWO and VYA isoconversional methods. In addition, a multi-reaction DAEM model of three reaction stages (henceforth 3R-Gaussian DAEM model) was also applied to the TGA data to obtain the kinetic parameters (activation energies and pre-exponential factors) of the degradation reaction steps. The parameters of the 3R-Gaussian DAEM model were estimated using a Levenberg-Marquardt algorithm [37], i.e. a non-linear least-squares minimization algorithm, evaluating the model for 100 equispaced conversion values.

4. Results and discussion

The DDs of the chitosans were calculated through the spectra acquired by FTIR (Fig. 1.a) using the Eq. (10). For the NaOH concentrations of 37.1, 37.9, 39.3, 45 and 52%, the DDs values were 54, 62, 69, 77, and 84%, respectively. In this work, chitosans are labeled according to their DD as C54, C62, C69, C77 and C84.

4.1. Structural characterization in the degradation process

FTIR spectra for the obtained chitosans at room temperature are shown in Fig. 1.a, in which different representative bands of chitosan are indicated. At room temperature, C54 sample exhibited a band at 3450 cm^{-1} that corresponds to O–H and N–H stretchings [9]. The region spectral between 3000 and 2800 cm^{-1} , is associated with symmetric and asymmetric stretchings of C–H from the ring and from CH_2OH and CH_3 groups. This sample presented a doublet at 1660 and 1630 cm^{-1} , attributed to C–O stretch of acetyl group [39]. Due to C–N–C stretch and the NH bending vibration, a characteristic GlcNAc units band at 1560 cm^{-1} is found in the C54 FTIR spectrum. Likewise, the band at 1320 cm^{-1} (symetric or asymmetric CH_2 stretching) is a typical signal of the GlcNAc units. The absorption band at 1035 cm^{-1} corresponds with the bridge O stretch [16,39]. By increasing the DD, some of these representative bands were altered in comparison with the C54 spectrum. Specifically, the signals between 3000 – 2800 cm^{-1} , except the band at 2875 cm^{-1} , decreased slightly for C62–C84 samples as result of the CH_3 elimination from the acetyl group of GlcNAc unit [38]. Moreover, the signal at 1630 cm^{-1} was not found in these spectra. In addition, these samples exhibited a emerging band at 1590 cm^{-1} (NH_2 bending vibration in amino group) due to the conversion of secondary amines into primary amines in the deacetylation process. For the same reason, the intensity of the band at 1560 cm^{-1} decreased as the DD was increased from 62 to 78; for the sample C84, the one with the highest DD, this signal was not found. Finally, the band at 1320 cm^{-1} decreased when the DD increased due to the less presence of the acetyl groups [40].

The temperatures selected to study the structural characterization in the degradation process were 290, 340, and $500\text{ }^\circ\text{C}$. FTIR spectra recorded at these temperatures of degradation are presented in Fig. 1.b–d, respectively. At $290\text{ }^\circ\text{C}$ for all studied samples, the bands at 3450 cm^{-1} decreased due to the dehydration of the samples; however, the diminution of the bands at 1660 and 1560 cm^{-1} was due to the deacetylation process that took place during the degradation of chitosan [9]. On the other hand, a new band at 1117 cm^{-1} (C–O–C stretch) appeared in the spectrum of the C54 and C62. This change was due to the result of depolymerization reactions and the cleavage glycosidic linkages attributable to the oxidation process [9,13]. At $340\text{ }^\circ\text{C}$, all the described bands practically disappeared for all samples, including the signal at 2875 cm^{-1} due to degradation to the pyranose ring [15], although for C54 sample the diminution was lower than for the other samples. The spectra recorded at $500\text{ }^\circ\text{C}$ did not show important differences, indicating the samples reacted to form a residue composed of carbonaceous structures [41].

FTIR analysis at different temperatures suggested that chitosan with the lowest DD (C54) was more thermally stable than the others, since its chemical structure changed less sharply with increasing temperature (Fig. 1.a–d).

4.2. Thermal stability

The thermal stability and the degradation stages of chitosans were analyzed employing the thermograms obtained from the TGA tests and the derivatives from these curves (DTG). The curves of the chitin raw material, C54 and C84 samples tested at a heating rate of $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ are shown in Fig. 2; values obtained at temperatures higher than $700\text{ }^\circ\text{C}$ are not shown because mass loss remained constant for all the samples.

Four peaks were found in the DTG curve of the chitin associated to four stages (Fig. 2.a). The first stage, between 30 – $130\text{ }^\circ\text{C}$, is attributed to water desorption [42]. The second and third peak overlapped in the range 130 – $400\text{ }^\circ\text{C}$, were due to the decomposition of polymer chains through deacetylation and cleavage of glycosidic linkages; at first, the degradation of chitosan D–glucosamine (Glc) units was produced (130 – $310\text{ }^\circ\text{C}$, with a reached conversion in dry basis of the 33%) and later decomposition of chitosan N–acetyl–D–glucosamine (GlcNAc)

units took place at a temperature range of 310 – $400\text{ }^\circ\text{C}$, with a conversion between 33 and 64% [9,20,42]. The last stage of thermal degradation occurred between 400 and $600\text{ }^\circ\text{C}$, and it was attributed to total degradation of chitosan ring and decomposition of the residual carbon [9,43].

The DTG curve of C84 sample was similar to that obtained for chitin (Fig. 2.c), being the mechanism of the degradation the same for both samples [9,20]. The same fact was also observed in C62, C69, and C77 curves (Fig. S.2). An important difference between chitin and C84 sample was the temperature of the maximum velocity reached in the overlapped of the degradation of Glc and GlcNAc units (second and third peaks). For chitin, this velocity was achieved at $332.6\text{ }^\circ\text{C}$, related to the degradation of GlcNAc units; and for C84 sample was $300\text{ }^\circ\text{C}$, consistent with the degradation of Glc units of chitosan. Therefore, the influence of DD on the degradation process was significant.

Based on these results, the degradation behavior of the C54 sample was intermediate between chitin and C84 (Fig. 2.b). In this case, in the C54 thermogram were discerned two peaks in the 130 – $400\text{ }^\circ\text{C}$ interval due to the similar amount of GlcNAc and Glc units in the polymer (54 and 46% of GlcNAc and Glc, respectively). The first of these peaks related to the degradation of Glc units, and the second with the degradation of GlcNAc units (maximum velocity of degradation at 300 and $343\text{ }^\circ\text{C}$, respectively), as stated above.

In all cases, increasing the heating ramp resulted in shifting the peaks of the stages to higher temperatures because of the heat transfer lag [9].

The thermal stabilities of the chitin employed as raw material and the chitosans with different DD were assessed by $T_{25\%}$ (on dry basis) because it corresponded with the second stage of the process of degradation (degradation of the Glc units), and therefore the DD was considered. All values for each used heating rate are shown in Table 1 together with the results of crystallinity obtained from XRD diffractograms (Fig. S.3).

Chitin raw material exhibited the highest thermal stability of the studied samples, between 309 and $325.1\text{ }^\circ\text{C}$, as shown in Table 1. It was followed by C54 sample, which presented thermal stabilities higher than the remaining chitosans (between 298.5 – $313.7\text{ }^\circ\text{C}$). This is in agreement with the results obtained from the study of the structural changes in the degradation process, since the C54 sample presented less structural changes than the other chitosans as temperature was increased (Section 4.1). By increasing the DD from 69 to 84%, the thermal stability of samples remained almost constant (e.g. 293.9 – $299.7\text{ }^\circ\text{C}$, for the $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ heating rate).

These results, together the obtained TGA thermograms (Fig. 2), suggest that the Glc and GlcNAc units forming the chitosan have different thermal stability. This fact is caused by the crystallinity of the GlcNAc units, a greater amount of these units in the polymer (less DD) causes a higher crystallinity index (being this index maximum for chitin raw material, 95.7%), and therefore the thermal stability of chitosan is increased [1,14,44]. However, for DD values higher than 62%, the crystallinity remained constant, between 72.3 and 75.7% for the C69, C78 and C84 samples. For this reason, there was not variation of the thermal stabilities of these samples. Interestingly, Nam, Park, Ihm and Hudson [20] observed that chitosans with different DD (59, 76 and 85%) presented similar thermal stabilities among them under N_2 atmosphere.

4.3. Kinetic study of thermal degradation of chitosans

4.3.1. Isoconversional methods

The activation energies as a function of the reached conversion obtained by applying of FWO and VYA methods are showed in Fig. 3. The obtained results demonstrated the strong dependence of the conversion on the activation energies for all the obtained chitosans and chitin.

At the beginning of the thermal degradation up to 70% conversion,

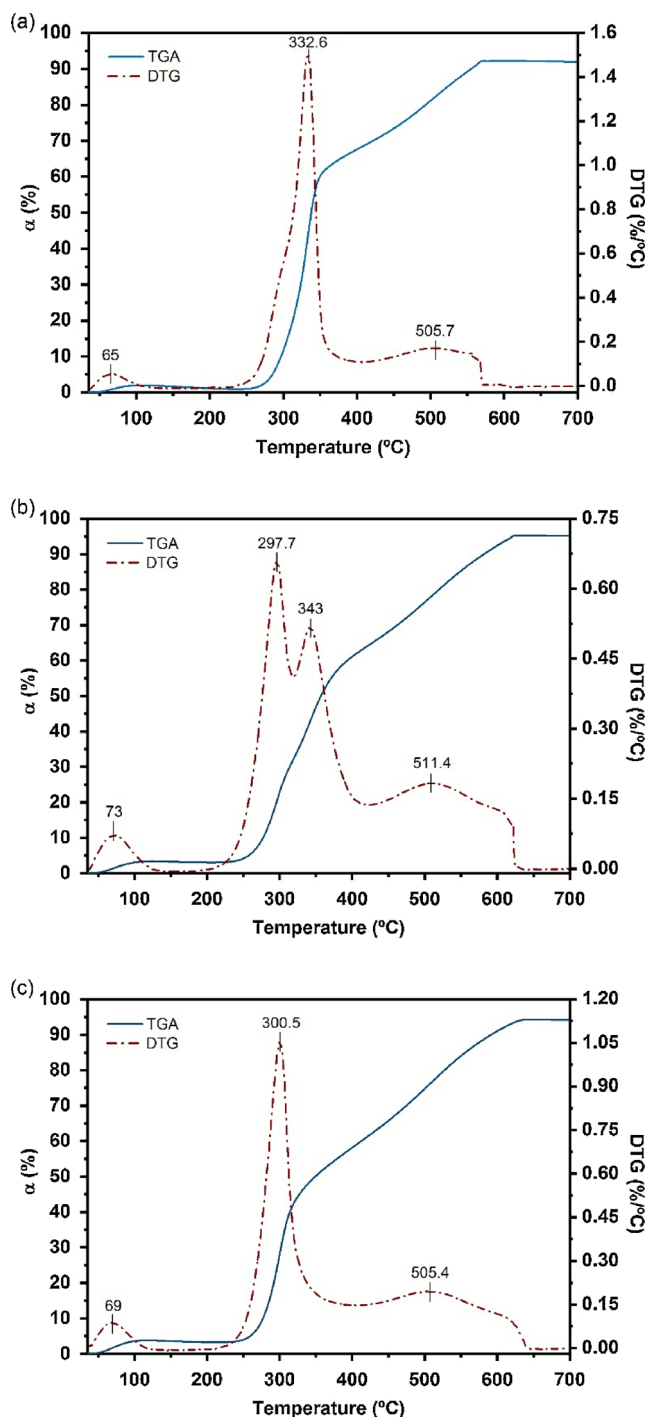


Fig. 2. TGA measurements and DTG curves of chitin (a), C54 (b), and C84 (c) at a heating rate of 10 °C/min.

Table 1

Values of $T_{25\%}$ at different heating rates and CrI for chitin raw material and obtained chitosans (mean values \pm SD, $n = 3$).

Sample	$T_{25\%}$					CrI (%)
	6 °C/min	8 °C/min	10 °C/min	12 °C/min	14 °C/min	
Chitin	309.9 \pm 0.5	314.7 \pm 0.1	319.8 \pm 0.3	321.8 \pm 0.6	325.1 \pm 0.1	95.7 \pm 1.9
C54	298.5 \pm 1.8	304.2 \pm 0.1	308.4 \pm 0.6	311.2 \pm 1.7	313.7 \pm 0.8	89.6 \pm 2.3
C62	289.2 \pm 1.0	294.7 \pm 0.1	297.3 \pm 0.3	300.4 \pm 0.6	302.7 \pm 0.4	82.6 \pm 3.3
C69	286.0 \pm 0.1	290.6 \pm 0.2	293.9 \pm 0.7	297.2 \pm 0.5	298.2 \pm 1.0	73.6 \pm 2.9
C77	288.4 \pm 1.0	291.7 \pm 0.5	296.2 \pm 0.2	299.4 \pm 0.7	301.9 \pm 0.5	72.3 \pm 2.9
C84	289.1 \pm 1.1	295.3 \pm 0.4	299.7 \pm 0.2	303.5 \pm 0.3	305.7 \pm 0.2	75.7 \pm 3.0

the activation energies of chitin raw material, calculated by FWO method, remained constant (\approx 150 kJ/mol), and by VYA method ranged between 168.9–207.3 kJ/mol. According to the chitin thermogram (Fig. 2.a), this interval belonged to degradation of GlcNAc units in the polymer. In 67% conversion, for both studied methods, there was a peak that, in agreement with TGA measurement (Fig. 2.a), is a transition between the degradation described above and the total degradation of chitosan ring and decomposition of the residual carbon ($\alpha > 70\%$, $E_a \approx 130$ kJ/mol) [9,43].

For the C54 sample, note that there were significant differences between this curve and the remaining chitosan samples, since this sample exhibited an extend peak from 5% to 65% conversion for both methods. In the FWO method, for conversions up to 27% (where the peak is localized) the activation energy increased from 120 to 152 kJ/mol. Similarly, for VYA method, until conversion of 22%, the activation energy raises from 152 to 203 kJ/mol. These conversion intervals were corresponded with the second peak of the TGA test, i.e. with the degradation of Glc units of the C54 sample. These results were similar to those found for chitin in this work and in literature (\sim 150 kJ/mol) [45–47]. From 27 and 22% until 66 and 63% (for FWO and VYA, respectively), the activation energy decreased until a mean value of 100 kJ/mol, in both methods. In this case, the reaction stage that took place was the degradation of the GlcNAc units, corresponding with the third stage of the TGA. In the studied methods, from 66 and 63%, for FWO and VYA, respectively, to 95%, occurred the rest of the decomposition of the polymer.

The behavior of the activation energy as a function of the conversion is similar for the chitosans C62, C69, C77 and C84 (Fig. 3). First, these samples presented an increase in the activation energy up to a maximum; then, the activation energy decreased until a constant value (between 90 and 120 kJ/mol). The maximum of the activation energies for C62 and C77 samples was 192 kJ/mol (for conversions of 38 and 42%, respectively) by the FWO method. For the same method, the C69 and C84 sample showed maxima of 201 and 148 kJ/mol (at the same conversion of 40%), respectively. However, by the VYA method, the maxima for these samples were 270, 287, 319, and 207 kJ/mol with conversions of 34, 37, 40 and 33% for C62, C69, C77, and C84, respectively. According to the results of TGA analysis, the overlapped degradation reactions of Glc and GlcNAc units of these samples started at 1% and ended at 60% of conversion, so that, unlike in the case of C54, it was not possible to distinguish the activation energies corresponding to these stages with the FWO and VYA methods, which evidences the difference of the degradation mechanism of C54 and the other chitosans. From 60 until 95%, the activation energy remained constant between 62–125 kJ/mol for chitosans C62–C84 due to the same reasons that the C54 sample. It is noted that the thermal behavior of C54 sample presented an intermediate behavior between that of the chitin and the rest of obtained chitosans, being nearer to that shown by chitin than the remaining chitosans, supported by both the shape of the curves of the activation energies with conversion (Fig. 3), the TGA thermograms (Fig. 2), and the results of the thermal stabilities (Table 1).

The obtained values of the activation energies of the chitosans

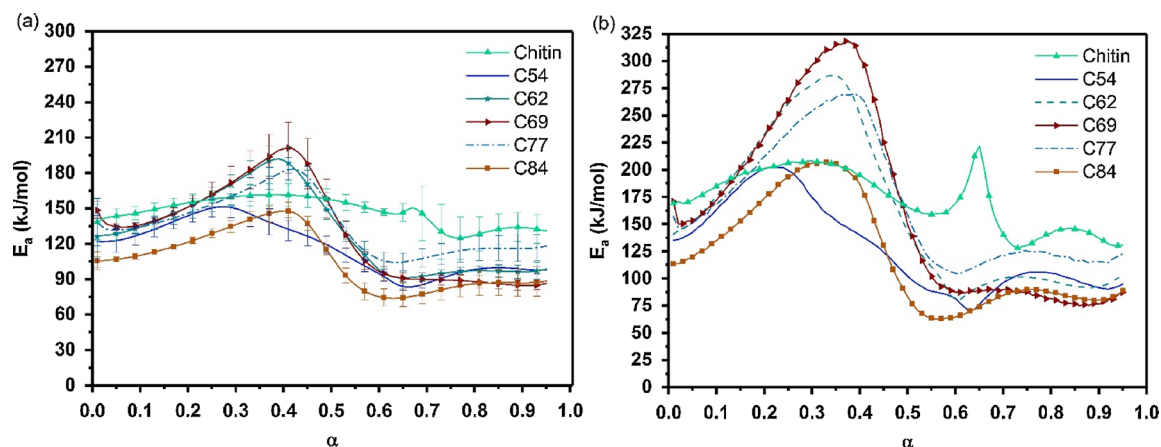


Fig. 3. Activation energy as function of conversion of all chitosans and chitin by applying the FWO (a) and VYA (b) methods.

Table 2

Activation energies obtained of chitosans by isoconversional methods in literature and this work in air atmosphere.

DD (%)	Method	Activation energy (kJ/mol)		Reference
		< 60% conversion	> 60% conversion	
≥ 75	KAS ^a	126 ^b	99.1 ^b	[47]
92	FWO	120.5 ^b	109.6 ^b	[13]
92	CR ^c	117.3 ^b	102.8 ^b	[13]
54-84	FWO	75-201	86-116	This work
54-84	VYA	62-319	80-125	This work

^a Kissinger-Akahira-Sunose [48].

^b Average value.

^c Coats-Redfern method [49].

degradations of 75–201 kJ/mol and 62–319 kJ/mol for FWO and VYA, respectively, are consistent with the mean values of the isoconversional methods applied for other authors for different isoconversional methods (Table 2), being these activation energies between 117.3–126 kJ/mol for the conversions until 60%, and 99.1–109.6 kJ/mol for conversions above 60% at different DD.

4.3.2. 3R-Gaussian DAEM model

According to TGA and DTG curves, three reaction steps took place in the degradation process on dry basis. For this reason, a 3R-Gaussian DAEM model was applied to the experimental data (Eq. 9). The experimental results of the DAEM models and their derivative curves for C54 and C84 samples are showed in Fig. 4, as well as the normalized contributions of each of the reaction stages are also included.

According to the Fig. 4.a–b, the first step (degradation of the Glc units) was given from 1 to 30% of conversion for C54 sample, and of 1 to 44% of the degradation process for C84 sample. However, the second reaction stage, corresponding with the degradations of the GlcNAc units, occurred between the 6 and 64% for C54 sample, and the 7 and 60% for C84 sample. In the case of the third reaction step, this began in a conversion of 12 and 5% for C54 and C84 sample, respectively; and ended in a 97% of the degradation process for both samples.

The parameters of the 3R-Gaussian DAEM model for each sample, mean activation energy (E_{aj}) and standard deviation (σ_j) of each distribution, and contribution of each reaction stage (c_j), together with the logarithm of the pre-exponential factors and mean square error (MSE), are shown in Table 3.

The MSE values confirmed the good fit of the experimental data and the model used. In general, both the activation energies and the pre-exponential factors obtained from to the all degradation reactions did not show a clear trend with the DD of the samples (as shown in Table 3). The mean activation energies for the first and second

degradation stages of chitin were the same (i.e. there was an overlapping of the first and second distributions of activation energies), indicating that the model is indeed splitting into two stages a single stage, because of the utilization of 3R-Gaussian DAEM model (deconvolution of a single stage into two stages is somehow forced because of model). In this case a 2R-Gaussian DAEM model could perfectly describe the thermal degradation of chitin. The reason of this is because the low amount of Glc units contained in chitin (only 5.2%); thus, the contribution of these units was negligible in the thermal degradation of chitin for 3R-Gaussian DAEM model.

As can be observed in Fig. 4.a–b, and specifically in Table 3, the contributions of the first (c_1) and second (c_2) reaction stages to the degradation process of the C54 and C84 were different. For the C54 sample, the first step had the least contribution (0.195), followed by the second (0.384), which had more contribution to the process than the first stage. The same tendency was found for chitin, confirming that the mechanism of degradation of this sample was similar to the degradation behavior of C54 sample. This trend did not occur in C84 sample ($c_1 = 0.332$; $c_2 = 0.166$), due to that this sample had a higher content in Glc units than the C54 (related to the first reaction step).

The cumulative distribution functions and the probability density functions for C54 and C84 samples, for each distribution function, are shown in Fig. 5.

The third distribution function (associated with the third reaction stage of degradation) exhibited wide ranges of the activation energy values (Fig. 5.b and c), followed by the second distribution function. These functions were wider than those contributed by the first distribution function, note that the standard deviations for the Gaussian curves in Table 3 were higher for the third distribution than for the others (σ values of 19.1 and 42.2 for C54 and C84, respectively), which also occurred for the C77 sample ($\sigma = 35.1$). However, for the C62 and C69 chitosans, this fact was not presented, being the standard deviations of the third functions lower than of the second ones. The low values of the standard deviations of the first reaction step for all samples suggest that this reaction occurs in a single step (Table 3 and Fig. 5.b and d).

In contrast to the isoconversional methods, with the 3R-Gaussian DAEM model was possible to acquire the activation energies related to each reaction stages of the degradation process for all chitosans, despite the overlapped of first and second reaction steps. The obtained data for the activation energies by this model for the first and second reaction steps (between 175 and 345 kJ/mol for all chitosans) were agreement, to a greater extent, with those obtained by VYA method (100–319 kJ/mol) than of with the FWO method (100–201 kJ/mol). Because of this and the VYA method is more accurate than the FWO (due to directly numerical integration), the proposed DAEM model was also more precise. On the other hand, the activation energies of the third reaction

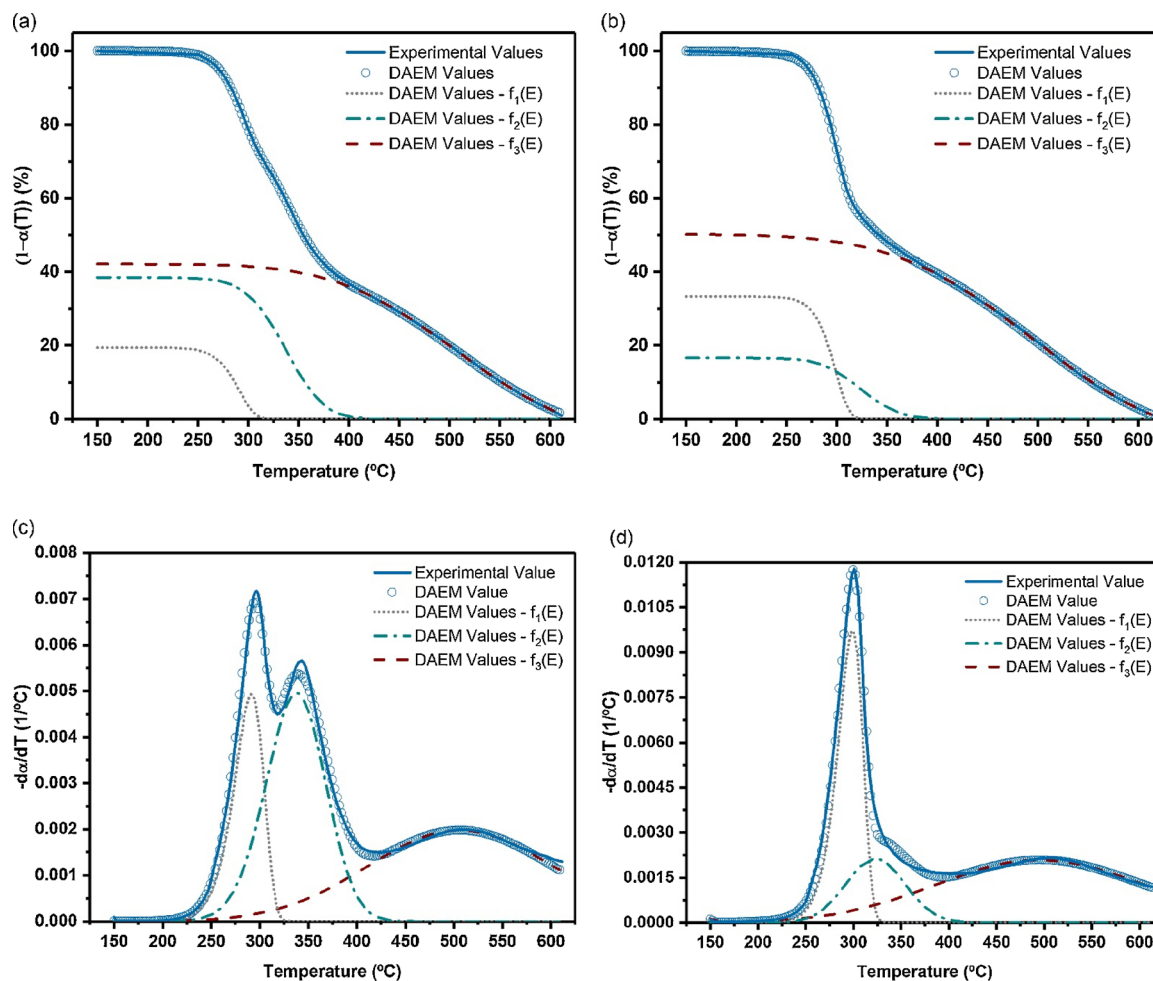


Fig. 4. Distributed activation energy model (DAEM) predictions for conversion of the C54 (a) and C84 (b) and their derivatives, (c) and (d), respectively.

Table 3

Kinetic parameters of the thermal degradation of chitin, C54, C62, C69, C77, and C84 calculated by the 3R-Gaussian DAEM model.

Parameters	Chitin	C54	C62	C69	C77	C84
E_{a1} (kJ/mol)	260.0	175.0	240.0	240.0	205.4	210.3
σ_1 (kJ/mol)	1.7	1.5	1.5	1.6	1.4	1.5
E_{a2} (kJ/mol)	260.4	185.8	205.6	207.8	346.3	345.0
σ_2 (kJ/mol)	10.2	7.6	27.8	28.6	17.7	17.2
E_{a3} (kJ/mol)	205.0	163.0	228.5	225.4	240.0	296.4
σ_3 (kJ/mol)	20.4	19.1	14.1	13.3	35.1	42.2
$\ln(k_{01})$	49.9	36.9	50.6	50.8	43.1	43.9
$\ln(k_{02})$	50.8	35.7	30.2	31.2	70.3	69.3
$\ln(k_{03})$	29.4	23.5	45.7	46.5	36.3	43.4
c_1	0.260	0.195	0.265	0.234	0.315	0.332
c_2	0.373	0.384	0.249	0.256	0.168	0.166
c_3	0.367	0.421	0.486	0.510	0.517	0.502
MSE ($\times 10^4$)	32.00	8.52	6.06	13.00	5.43	7.43

stages were between 163 and 296.4 kJ/mol for the DAEM model, higher than that of the isoconversional methods (90–100 kJ/mol). However, the DAEM values are in agreement with the isoconversional methods of the literature (Table 2). In the same line, the pre-exponential factors are included within the ranges found by other authors, i.e. orders of magnitude from 10 to 24 [9,11,18].

For all these reasons, the proposed 3R-Gaussian DAEM model offers a great option to model the thermal degradation behavior and obtain

the kinetic parameters of the stages of the degradation of chitosan in oxidizing atmosphere compared to isoconversional methods.

5. Conclusions

The thermal behavior of the chitosan degradation with different DD (54–84%) was studied in dynamic conditions under air atmosphere. The degradation of chitosan in these conditions was produced in four stages, but as DD increased, the overlap of the intermediate stages was observed, and therefore three stages could only be distinguished. The C54 chitosan presented the highest thermal stability in relation to the rest of samples studied.

The results of isoconversional methods showed a strong dependence with the conversion and ranged from 75 and 201 kJ/mol for FWO, and between 62 and 319 kJ/mol for VYA. However, with these methods were not possible to assign the values of the activation energies associated to the first and second degradation reaction steps due to the overlapped between them. The 3R-Gaussian DAEM model allowed to obtain the activation energies for each one of reaction stages of thermal degradation of chitosan (E_{a1} : 175–240 kJ/mol; E_{a2} : 185.8–346.3 kJ/mol; E_{a3} : 163–296.4 kJ/mol), being this model more accurate than the isoconversional methods applied. The results showed that the 3R-Gaussian DAEM model is a suitable option for the kinetic study of the chitosan thermal degradation for any degree of deacetylation.

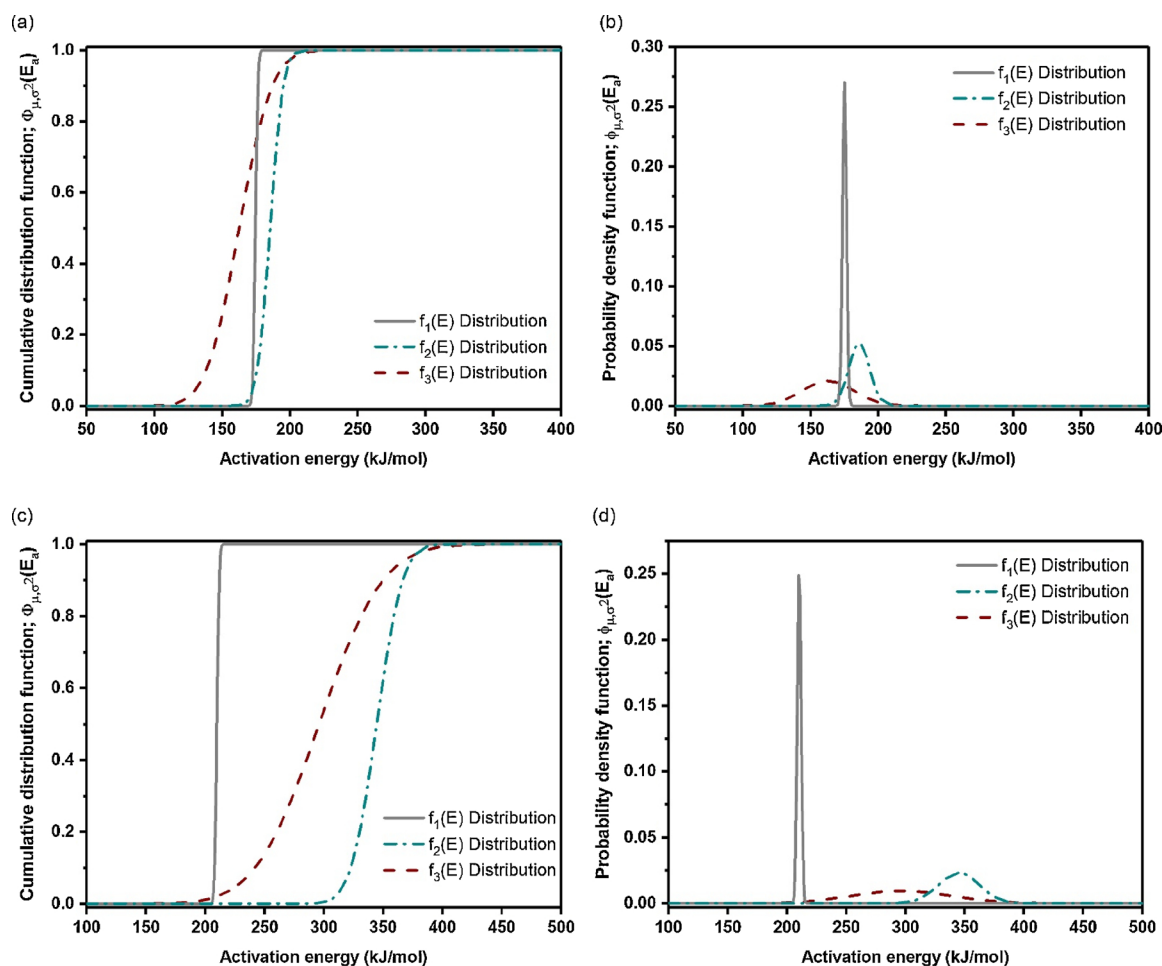


Fig. 5. Distributed activation energy model (DAEM) cumulative distribution functions of the C54 (a) and C84 (c) samples, and probability density functions: C54 (b) and C84 (d).

Acknowledgments

The authors are grateful to the “Comunidad Autónoma de Madrid” (Spain) for financial support (project S2013/MAE-2800).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.tca.2018.10.004>.

References

- [1] I. Aranz, M. Mengibar, R. Harris, I. Paños, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, Á. Heras, Functional characterization of chitin and chitosan, *Curr. Chem. Biol.* 3 (2009) 203–230.
- [2] A. Baranwal, A. Kumar, A. Priyadarshini, G.S. Oggu, I. Bhatnagar, A. Srivastava, P. Chandra, Chitosan: an undisputed bio-fabrication material for tissue engineering and bio-sensing applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 110 (2018) 110–123.
- [3] J. Wang, S. Zhuang, Removal of various pollutants from water and wastewater by modified chitosan adsorbents, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 47 (2018) 2331–2386.
- [4] C. Peniche, W. Argüelles-Monal, F. Goycoolea, Chitin and chitosan: major sources, properties and applications, in: M. Belgacem, A. Gandini (Eds.), *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, Elsevier Ltd., 2008, pp. 517–542.
- [5] K. Kurita, Controlled functionalization of the polysaccharide chitin, *Prog. Polym. Sci.* 26 (2001) 1921–1971.
- [6] G.A.F. Roberts, *Chitin Chemistry*, Macmillan Press, London, 1992.
- [7] M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini, Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 981–1014.
- [8] M. Rinaudo, Chitin and chitosan: properties and applications, *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 603–632.
- [9] H. Moussout, H. Ahlafi, M. Aazza, M. Bourakhouadar, Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis, *Polym. Degrad. Stab.* 130 (2016) 1–9.
- [10] M.N.V.R. Kumar, A review of chitin and chitosan applications, *React. Funct. Polym.* 46 (2000) 1–27.
- [11] D. de Britto, S.P. Campana-Filho, Kinetics of the thermal degradation of chitosan, *Thermochim. Acta* 465 (2007) 73–82.
- [12] E. Salehi, P. Daraei, A.A. Shamsabadi, A review on chitosan-based adsorptive membranes, *Carbohydr. Polym.* 152 (2016) 419–432.
- [13] Y.-H. Hao, Z. Huang, Q.-Q. Ye, J.-W. Wang, X.-Y. Yang, X.-Y. Fan, Y.-L. Li, Y.-W. Peng, A comparison study on non-isothermal decomposition kinetics of chitosan with different analysis methods, *J. Therm. Anal. Calorim.* 128 (2017) 1077–1091.
- [14] T. Wanjun, W. Cunxin, C. Donghua, Kinetic studies on the pyrolysis of chitin and chitosan, *Polym. Degrad. Stab.* 87 (2005) 389–394.
- [15] J. Zawadzki, H. Kaczmarek, Thermal treatment of chitosan in various conditions, *Carbohydr. Polym.* 80 (2010) 394–400.
- [16] F. López, A. Mercè, F. Alguacil, A. López-Delgado, A kinetic study on the thermal behaviour of chitosan, *J. Therm. Anal. Calorim.* 91 (2008) 633–639.
- [17] L. Zeng, C. Qin, L. Wang, W. Li, Volatile compounds formed from the pyrolysis of chitosan, *Carbohydr. Polym.* 83 (2011) 1553–1557.
- [18] M. Gámiz-González, D.M. Correia, S. Lanceros-Mendez, V. Sencadas, J.G. Ribelles, A. Vidaurre, Kinetic study of thermal degradation of chitosan as a function of deacetylation degree, *Carbohydr. Polym.* 167 (2017) 52–58.
- [19] Y. Qiao, S. Chen, Y. Liu, H. Sun, S. Jia, J. Shi, C.M. Pedersen, Y. Wang, X. Hou, Pyrolysis of chitin biomass: TG–MS analysis and solid char residue characterization, *Carbohydr. Polym.* 133 (2015) 163–170.
- [20] Y.S. Nam, W.H. Park, D. Ihm, S.M. Hudson, Effect of the degree of deacetylation on the thermal decomposition of chitin and chitosan nanofibers, *Carbohydr. Polym.* 80 (2010) 291–295.
- [21] S. Vyazovkin, A.K. Burnham, J.M. Criado, L.A. Pérez-Maqueda, C. Popescu, N. Sbirrazzuoli, ICTAC Kinetics Committee recommendations for performing kinetic computations on thermal analysis data, *Thermochim. Acta* 520 (2011) 1–19.
- [22] T. Ozawa, A new method of analyzing thermogravimetric data, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 38 (1965) 1881–1886.
- [23] J.H. Flynn, L.A. Wall, General treatment of the thermogravimetry of polymers, *J.*

- Res. Nat. Bur. Stand. 70A (1966) 487–523.
- [24] S. Vyazovkin, Evaluation of activation energy of thermally stimulated solid-state reactions under arbitrary variation of temperature, *J. Comput. Chem.* 18 (1997) 393–402.
- [25] S. Vyazovkin, Modification of the integral isoconversional method to account for variation in the activation energy, *J. Comput. Chem.* 22 (2001) 178–183.
- [26] S. Vyazovkin, D. Dollimore, Linear and nonlinear procedures in isoconversional computations of the activation energy of nonisothermal reactions in solids, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 36 (1996) 42–45.
- [27] K. Muraleedharan, P. Alikutty, V.A. Mujeeb, K. Sarada, Kinetic studies on the thermal dehydration and degradation of chitosan and citralidene chitosan, *J. Polym. Environ.* 23 (2015) 1–10.
- [28] V. Vand, A theory of the irreversible electrical resistance changes of metallic films evaporated in vacuum, *Proc. Phys. Soc.* 55 (1943) 222.
- [29] G. Pitt, The kinetics of the evolution of volatile products from coal, *Fuel* 41 (1962) 267–274.
- [30] J. Cai, T. Li, R. Liu, A critical study of the Miura–Maki integral method for the estimation of the kinetic parameters of the distributed activation energy model, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 3894–3899.
- [31] W. Wu, Y. Mei, L. Zhang, R. Liu, J. Cai, Effective activation energies of lignocellulosic biomass pyrolysis, *Energy Fuels* 28 (2014) 3916–3923.
- [32] J. Cai, W. Wu, R. Liu, G.W. Huber, A distributed activation energy model for the pyrolysis of lignocellulosic biomass, *Green Chem.* 15 (2013) 1331–1340.
- [33] M.H. Ottey, K.M. Vårum, O. Smidsrød, Compositional heterogeneity of heterogeneously deacetylated chitosans, *Carbohydr. Polym.* 29 (1996) 17–24.
- [34] L. Raymond, F.G. Morin, R.H. Marchessault, Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR, *Carbohydr. Res.* 246 (1993) 331–336.
- [35] J. Brugnerotto, J. Lizardi, F.M. Goycoolea, W. Argüelles-Monal, J. Desbrieres, M. Rinaudo, An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, *Polymer* 42 (2001) 3569–3580.
- [36] B. Focher, P.L. Beltranme, A. Naggi, G. Torri, Alkaline *N*-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structure modifications, *Carbohydr. Polym.* 12 (1990) 405–418.
- [37] J. Cai, R. Liu, Weibull mixture model for modeling nonisothermal kinetics of thermally stimulated solid-state reactions: application to simulated and real kinetic conversion data, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 10681–10686.
- [38] M. Duarte, M. Ferreira, M. Marvao, J. Rocha, An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy, *Int. J. Biol. Macromol.* 31 (2002) 1–8.
- [39] J. Singh, P. Dutta, J. Dutta, A. Hunt, D. Macquarrie, J. Clark, Preparation and properties of highly soluble chitosan–l-glutamic acid aerogel derivative, *Carbohydr. Polym.* 76 (2009) 188–195.
- [40] A. Pawlak, M. Mucha, Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends, *Thermochim. Acta* 396 (2003) 153–166.
- [41] V. Gomez-Serrano, J. Pastor-Villegas, A. Perez-Florindo, C. Duran-Valle, C. Valenzuela-Calahorra, FT-IR study of rockrose and of char and activated carbon, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 36 (1996) 71–80.
- [42] I. Corazzari, R. Nisticò, F. Turci, M.G. Faga, F. Franzoso, S. Tabasso, G. Magnacca, Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: thermal degradation and water adsorption capacity, *Polym. Degrad. Stab.* 112 (2015) 1–9.
- [43] A. Martínez-Camacho, M. Cortez-Rocha, J. Ezquerra-Brauer, A. Graciano-Verdugo, F. Rodríguez-Félix, M. Castillo-Ortega, M. Yépiz-Gómez, M. Plascencia-Jatomea, Chitosan composite films: thermal, structural, mechanical and antifungal properties, *Carbohydr. Polym.* 82 (2010) 305–315.
- [44] E.S. Abdou, K.S. Nagy, M.Z. Elsabee, Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 1359–1367.
- [45] V. Georgieva, D. Zvezdova, L. Vlaev, Non-isothermal kinetics of thermal degradation of chitin, *J. Therm. Anal. Calorim.* 111 (2013) 763–771.
- [46] P. Stolarek, S. Ledakowicz, Pyrolysis kinetics of chitin by non-isothermal thermogravimetry, *Thermochim. Acta* 433 (2005) 200–208.
- [47] V. Georgieva, D. Zvezdova, L. Vlaev, Non-isothermal kinetics of thermal degradation of chitosan, *Chem. Cent. J.* 6 (2012) 81.
- [48] T. Akahira, T. Sunose, Method of determining activation deterioration constant of electrical insulating materials, *Res. Rep. Chiba Inst. Technol.* 16 (1971) 22–31.
- [49] A.W. Coats, J. Redfern, Kinetic parameters from thermogravimetric data, *Nature* 201 (1964) 68.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Thermal and kinetics of the degradation of chitosan with different deacetylation degrees under oxidizing atmosphere

M. Mar Villar-Chavero*, Juan C. Domínguez, M. Virginia Alonso, Mercedes Oliet,
Francisco Rodriguez

Chemical Engineering and Materials Department, Complutense University of Madrid,
Av. Complutense S/N, 28040, Madrid, Spain

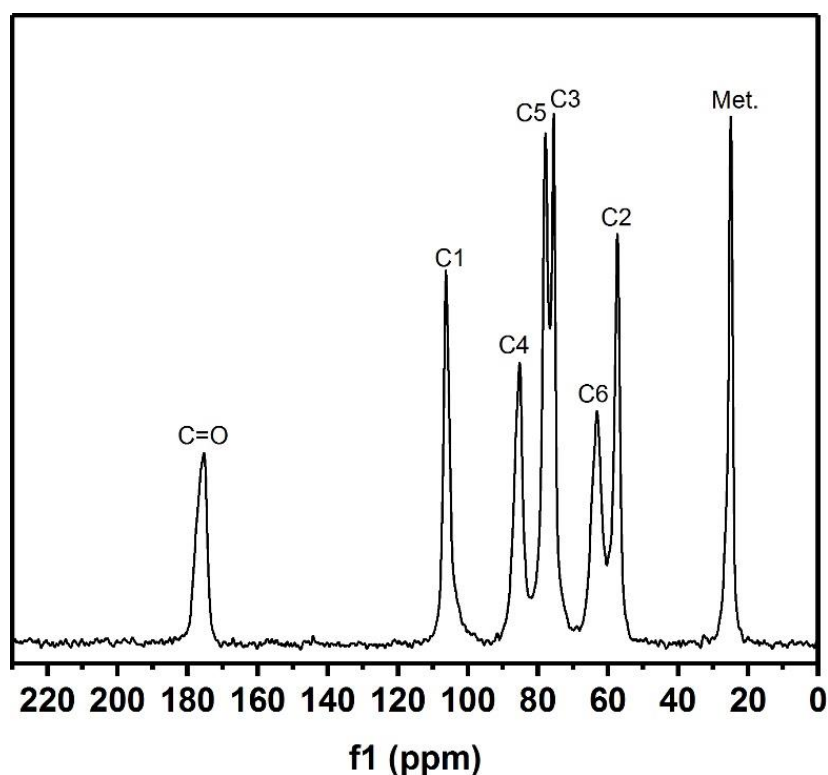


Figure. S.1. ^{13}C CP/MAS NMR of the chitin from Alaska snow crab shells.

* Corresponding author: M. Mar Villar-Chavero (mdm.villar@ucm.es)

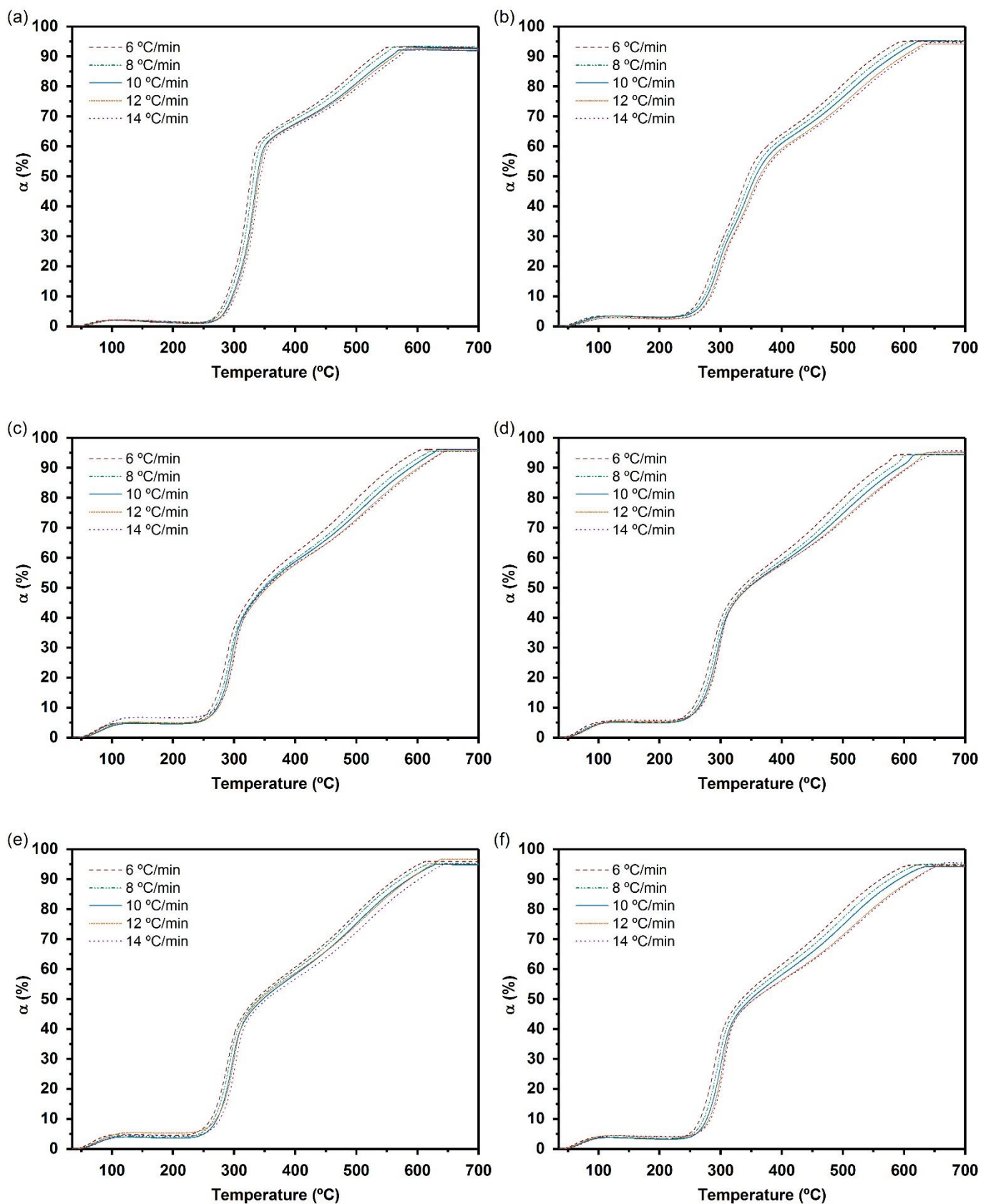


Figure. S.2. TGA curves of chitin raw material (a), C54 (b), C62 (c), C69 (d), C77 (e) and C84 (f) at different heating rates.

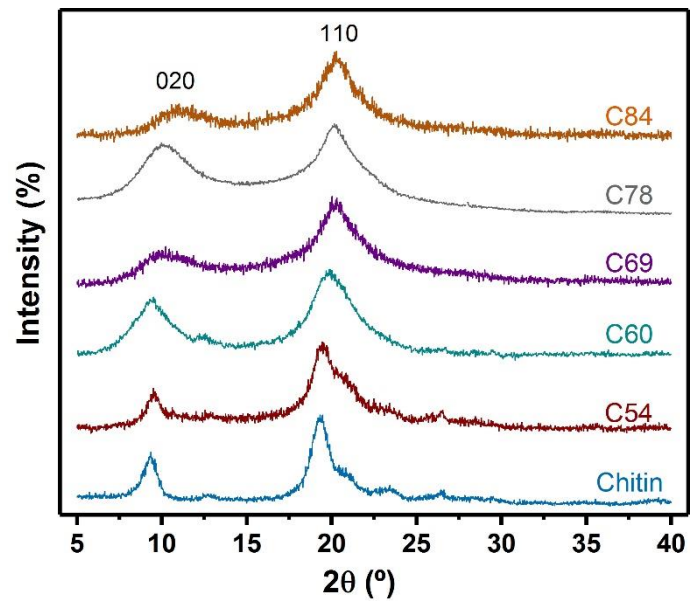


Figure. S.3. XRD diffractograms of chitin raw material and obtained chitosans with different degree of deacetylation.

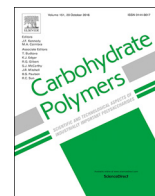
PUBLICACIÓN II

“Tuning the rheological properties of cellulosic ionogels reinforced with chitosan: The role of the deacetylation degree”

M. Mar Villar-Chavero, Juan C. Domínguez, M. Virginia Alonso,
Mercedes Oliet y Francisco Rodríguez

Carbohydrate Polymers, 2019, 207, 775-781





Tuning the rheological properties of cellulosic ionogels reinforced with chitosan: The role of the deacetylation degree



M. Mar Villar-Chavero*, Juan C. Domínguez, M. Virginia Alonso, Mercedes Oliet, Francisco Rodriguez

Chemical Engineering and Materials Department, Complutense University of Madrid, Av. Complutense S/N, 28040, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Ionogel
Cellulose
Chitosan
Deacetylation degree
Reinforcement
Rheology

ABSTRACT

The rheological and thermal properties of formulated cellulosic ionogels reinforced with chitosan with 54–84% deacetylation degrees (DDs) were studied. The ionogels were stable, and the linear viscoelastic regions (LVRs) were determined. The rheological spectra of the ionogels revealed strong physical gels. Moreover, the effect of the DD on the viscoelastic properties was significant. The ionogel reinforced with chitosan with a DD of 84% exhibited the greatest viscoelastic properties (G' : ~10.6 kPa, G'' : 20.6–1.7 kPa, and η^* : 200–0.05 kPa s).

The ionogels exhibited the same glass transition temperature, which was approximately -98 °C, and a melting temperature of 40 °C. In addition, these materials were shown to be thermoreversible. This study provided basic rheological and thermal evidence that could be used to design new ionogels reinforced with chitosan with a specific DD for use as scaffolds for wound management.

1. Introduction

Ionogels are hybrid materials with a dispersed liquid phase consisting of an ionic liquid (IL) and a continuous solid phase that is organic (biopolymers, low molecular weight gelators, metalloids, etc.), inorganic (ceramics, metals, nanotubes, etc.), or a hybrid organic-inorganic compound (Le Bideau, Viau, & Vioux, 2011; Marr & Marr, 2016). Physical or chemical interactions between the solid phase and ionic liquid are important because these interactions determine the physical properties of ionogels (Marr & Marr, 2016). ILs are greatly attractive because of the possibility of tuning their properties by using different anion-cation combinations (Vioux, Viau, Volland, & Le Bideau, 2010). In addition, the use of ILs for the formulation of ionogels offers a unique combination of properties, such as thermal stability, high conductivity, and nonflammability (Marr & Marr, 2016). Currently, these gels are emerging as functional materials in different sectors, such as chemical catalysis or biocatalysis (Bothwell & Marr, 2017; Sharma & Gupta, 2016; Vittoz et al., 2018), energy production (Fan, Wei, Li, Li, & Lu, 2018; Seo & Moon, 2018), sensors or biosensors (Ghorbanizamani & Timur, 2017; Gil-González, Akyazi, Castaño, Benito-Lopez, & Morant-Miñana, 2017; Zhang, Wang, Peng, Yan, & Pan, 2018), pharmaceuticals (Brevet et al., 2016) or manufacturing of other material composites (Niroomand, Khosravani, & Younesi, 2016; Takada & Kadokawa, 2015).

Polysaccharides, such as cellulose, are of great interest as a continuous phase of ionogels because of their abundance and biodegradability and biorenewability (Zhang et al., 2017). Cellulose is a polysaccharide composed of glucose units linked through β -(1–4) glycosidic linkages. This polysaccharide is usually used for the development of cellulose-based ionogels due to its well-known dissolution capability in conventional ionic liquids (Takada & Kadokawa, 2015). Furthermore, these materials show promising properties, such as transparency, flexibility, transferability, thermoreversible gelling capability, etc. (Thiemann et al., 2014). Cellulose-based ionogels have a new potential use as an ink for 3D printing since they can be used to obtain 3D structures to produce materials, such as biological scaffolds or packaging (Markstedt, Sundberg, & Gatenholm, 2014). In this case, an initial study of the viscoelastic properties of these materials (rheological behavior) is necessary to determine the viability of the formulated structures. Moreover, knowledge of the thermal properties is also necessary to determine the temperature for use.

Chitosan, a polysaccharide with a similar structure to cellulose, is a copolymer composed of *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) units and D-glucosamine (Glc) units. The molecular weight and the deacetylation degree (DD) are the most important properties of chitosan. The DD is defined as the molar fraction of Glc units present in the polymeric chain. Accordingly, if the DD is less than 50%, the biopolymer is

* Corresponding author.

E-mail addresses: mdm.villar@ucm.es (M.M. Villar-Chavero), jucdomin@ucm.es (J.C. Domínguez), valonso@ucm.es (M.V. Alonso), moliet@ucm.es (M. Oliet), frsommel@ucm.es (F. Rodriguez).

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.041>

Received 12 December 2018; Accepted 15 December 2018

Available online 17 December 2018

0144-8617/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

referred to as chitin, and if the DD is greater than 50%, the polymer is referred to as chitosan (Chang, Tsai, Lee, & Fu, 1997). This biopolymer has good biological properties, such as antioxidant, antiholesterolemic, antimicrobial, analgesic, and hemostatic properties, among others (Dash, Chiellini, Ottenbrite, & Chiellini, 2011). In addition to its attractive biological properties, chitosan has also been shown to be a good reinforcer of different materials, such as sponges, hydrogels, waterborne polyurethane, etc. (Fangbing, Wang, Zhu, & Zhang, 2014; Fu, Wang, Chen, & Xiao, 2015; Sun et al., 2018). However, to date, there have not been any studies that used chitosan as reinforcement material for ionogels.

The aim of this study was to formulate cellulosic ionogels using 1-butyl-3-methylimidazolium chloride (BmimCl) as the ionic liquid reinforced with chitosan with different DDs and to investigate the influence of the DD on the rheological and thermal properties. This study is intended to provide the necessary basic characteristics that could be used to design potential new reinforced ionogels for use as scaffolds for wound management.

2. Material and methods

2.1. Materials

Avicel® PH-101 microcrystalline cellulose obtained from Sigma-Aldrich (degree of polymerization: 230) and 1-butyl-3-methylimidazolium chloride (BmimCl) with a purity greater than 99% mass fraction obtained from Iolitec GmbH were used for the formulation of the ionogels.

Chitosan employed as reinforcement of the ionogels were obtained by deacetylation process of chitin (*Chionoecetes opilio* supplied by G.T.C. Bio Corporation, China) using different percentages of sodium hydroxide to obtain chitosan with DDs of 54, 62, 69, 77 and 84%, as described in a previous study (Villar-Chavero, Domínguez, Alonso, Oliet, & Rodríguez, 2018).

2.2. Determination of the viscosity average molecular weight (M_v) of chitosan

The physicochemical identity of chitosan is defined by the molecular weight and the DD (Dash et al., 2011). Therefore, the variation in the viscosity average molecular weight (M_v) of the obtained chitosan was determined to be able to conduct investigations based on the DD. To determine the M_v , chitosan samples with concentrations between 0.085 and 0.46 mg/mL were prepared in 0.2 M acetic acid/0.1 M sodium acetate aqueous solution for 5 h at 60 °C in a covered glass vessel to achieve the complete dissolution of chitosan. Then, these solutions were left to stand until they reached room temperature. The M_v was estimated according to a previous study conducted by Wang, Bo, Li, and

Qin (1991) through the determination of the intrinsic viscosity (η) using the Mark-Houwink equation (Eq. (1)). The η was determined by measuring the passage time using a Cannon Fenske 100 capillary viscometer in a water bath at 30 °C:

$$\eta = K \cdot M_v^n \quad (1)$$

$$K = 1.64 \cdot 10^{-30} \cdot DD^{14} \quad (2)$$

$$n = -1.02 \cdot 10^{-2} \cdot DD + 1.82 \quad (3)$$

where K and n are functions of the DD of chitosan.

2.3. Preparation of the ionogels reinforced with chitosan

The ionogels were prepared according to the following steps: conditioning of the raw materials, preparation of the ionogel matrix, incorporation of reinforcement, and a gelation process. The conditioning of raw materials consisted of removing moisture from BmimCl, cellulose and chitosan for 12 h in a vacuum oven at 40 °C.

The operating conditions for the preparation of the ionogel matrix (BmimCl and cellulose) were based on previous studies (Tran, Duri, Delneri, & Franko, 2013; Tran, Duri, & Harkins, 2013). BmimCl was placed in a glass vessel with a hermetic seal, which was inertized and heated for 10 min at 100 °C under magnetic stirring (600 rpm) until the ionic liquid was completely melted. Then, the dried cellulose was added in three doses of 2 wt.%, up to 6 wt.% (by weight of the ionic liquid). After each addition, the vessel was inertized, and the next dose was not added until the previous dose was completely dissolved. Optical microscopy images were acquired using a Zeiss Axio Scope.A1 microscope with a Zeiss AxioCam ICc 1 camera to determine the complete dissolution time of cellulose in BmimCl. The time of dissolution was 6 h after the administration of the first dose (Fig. S1).

The reinforcement material was incorporated into the matrix under the same conditions (100 °C and 600 rpm). Chitosan with a specific DD was added in three doses of 1% up to 3% (w/w of matrix) every 30 min to avoid aggregation.

The gelation process was conducted by pouring the mixture into a steel mold covered with a PET film (GoodFellow Milinex® 0.075 mm). The mold was placed in a Vötsch VCL 4006 climate chamber with a relative humidity of 40% for 5 days at 25 °C to ensure complete gelation. The process used to obtain the formulated ionogels is shown as a schematic in Fig. 1.

In this study, the obtained ionogels are denoted as Gel54, Gel62, Gel69, Gel77, and Gel84 according to the DD of the reinforcement material used in their formulations.

2.4. Rheological testing

All rheological testing was performed using an ARES rheometer (TA

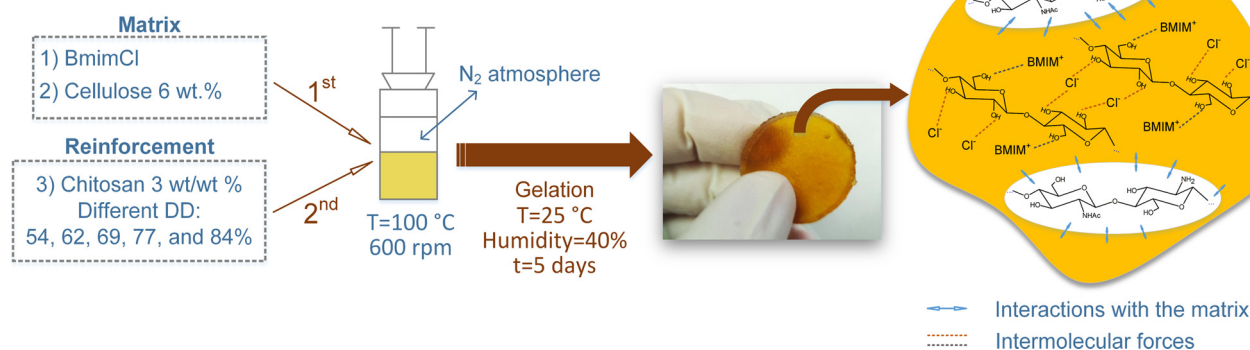


Fig. 1. Schematic of the formulation of ionogels reinforced with chitosan.

Instruments) with a 25 mm diameter serrated parallel plates geometry and a gap of 2.5 mm. Time sweep tests were performed at 25 °C with a frequency of 1 Hz and a shear strain of 0.1% for 20 min to establish the stability of the ionogels. Strain sweep tests were performed at 25 °C with a frequency of 50 Hz (the maximum frequency used to obtain the rheological spectra in the dynamic frequency sweep test) and a strain range from 0.1 to 10% to determine the linear viscoelastic region of the ionogels. Dynamic frequency sweep tests were conducted to obtain the rheological spectra at 25 °C using a frequency range from 0.01 to 50 Hz and applying a 0.5% strain (within the linear viscoelastic region).

2.5. Differential scanning calorimetry analysis

The calorimetric measurements were performed using a Mettler Toledo® 821° differential scanning calorimetry (DSC) instrument with a medium pressure crucible (ME-26929) with a volume of 120 µL to determine the glass transition temperature (T_g) and the melting point (T_m). DSC runs were performed with three steps of the heating/cooling/heating program following the specifications of ASTM-E1356, i.e., from –140 to 130 °C using a 10 °C min⁻¹ heating rate and from 130 to –140 °C using a 20 °C min⁻¹ cooling rate, and both of these ramps were used to remove the thermal history of the ionogels. Finally, the measurement was conducted from –140 °C to 130 °C using a heating rate of 10 °C min⁻¹. The sample weight was between 15 and 20 mg. The DSC experiments were carried out under a nitrogen atmosphere (flow rate of 20 mL/min).

2.6. Thermoreversibility testing

Thermoreversibility testing was performed on the samples to determine whether these ionogels were reversible by the temperature (Wang, Yu et al., 2018). Therefore, the ionogels were melted for 20 min at 60 °C in a test tube to achieve complete melting. Then, the ionogels were left to stand for 1 day at room temperature to evaluate the re-gelation of the ionogels.

3. Results and discussion

The viscosity average molecular weights ($M_{v,s}$) of the chitosans used as reinforcement of the formulated ionogels are shown in Table 1. The obtained $M_{v,s}$ showed a similar order of magnitude (~10⁶ g/mol). For this reason, in the discussion of the present study regarding the characteristic properties of chitosan, only the DD was considered a differentiating property among the obtained chitosans.

3.1. Stability of the ionogels and the linear viscoelastic region

The stability of the ionogels was analyzed through time sweep tests using a rheometer at 25 °C. The results of these tests for the ionogels formulated with chitosan at different DDs are shown in Fig. S2. For all ionogels, the complex modulus (G^*) and the complex viscosity (η^*) remained constant over time; therefore, the samples were stable.

Furthermore, the results of the strain sweep tests for the formulated ionogels are shown in Fig. 2. The limit of the linear viscoelastic region (LVR) for samples Gel69, Gel77, and Gel84 reached a strain of 1.77%.

Table 1

Viscosity average molecular weights ($M_{v,s}$) and parameters for their determination of the chitosan samples used as reinforcement materials in the ionogels.

Chitosan DD (%)	K	n	η (mL/mg)	M_v (g mol ⁻¹)
54	$2.86 \cdot 10^{-6}$	1.27	135	$1.09 \cdot 10^6 \pm 2.19 \cdot 10^4$
62	$1.29 \cdot 10^{-5}$	1.21	243	$1.06 \cdot 10^6 \pm 2.11 \cdot 10^4$
69	$9.09 \cdot 10^{-5}$	1.12	422	$9.38 \cdot 10^6 \pm 1.88 \cdot 10^4$
77	$5.06 \cdot 10^{-4}$	1.02	707	$9.97 \cdot 10^5 \pm 1.99 \cdot 10^4$
84	$1.45 \cdot 10^{-3}$	0.96	619	$7.10 \cdot 10^5 \pm 1.42 \cdot 10^4$

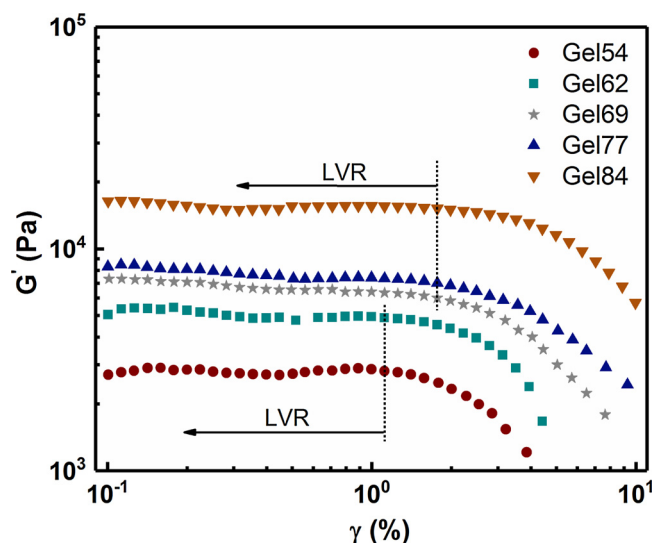


Fig. 2. Strain sweep tests for all formulated ionogels at 25 °C.

However, Gel62 and Gel54 ionogels showed the end of the LVR at a strain of 1.12%. Consequently, Gel84, Gel77, and Gel69 showed greater strength of the molecular structure than Gel62 and Gel54. In all cases, the strain applied in the dynamic frequency sweep test was within the LVR.

3.2. Rheological spectra

The rheological spectra were obtained for the formulated materials by dynamic frequency sweep tests once the stability and the linear viscoelastic region of the ionogels were determined. The elastic (G') and loss moduli (G'') spectra of the reinforced ionogels are shown in Fig. 3.

The variation of the elastic and loss moduli in the rheological spectra leads to the identification of different regions according to the dominant behavior (Barnes, 2000). The spectra of the studied ionogels were located within the *plateau* region since elastic behavior was predominant in the spectrum ($G' > G''$), and it remained constant with the frequency in all cases. The dependence of the elastic modulus was determined by a power-law model as follows:

$$G' = G_0 \cdot \omega^a \quad (4)$$

where G_0 (Pa s^a) is a constant, which is the intercept with the log G' -axis, and a is the slope of the log G' -log frequency curve. G_0 is the gel strength, i.e., the measure of the elastic energy stored in the unit volume of the network, defined mathematically by Eq. (5) (Ranjan, Rawat, & Bohidar, 2017) as follows:

$$G_0 = \lim_{\omega \rightarrow 0} G'(\omega) \quad (5)$$

The values of the linear fitting of the spectra using Eq. (4) are shown in Table 2. The loss moduli could not be fitted because of the strong dependence at high frequency values in the spectra of the formulated ionogels.

The parameter a indicates the behavior of the gels in the *plateau* region; the closer the value of a is to 0, the greater the solid behavior (Larson, 1999). In all cases, the ionogels showed values of this parameter at approximately 0; therefore, the materials exhibited a solid-like behavior. Therefore, the formulated ionogels were classified as strong gels (Ross-Murphy, 1995). Moreover, the matrix of the studied ionogels was composed of physical interactions (Fig. 1) consisting of hydrogen bonds between –OH groups of cellulose and the anion and cation of BmimCl (Peng, Wang, Xu, & Dai, 2018), forming a physically well-structured network (strong physical gel). This was corroborated by the (G'/G'')_{mean} ratios, which ranged between 8.41 and 12.8 (Table 2).

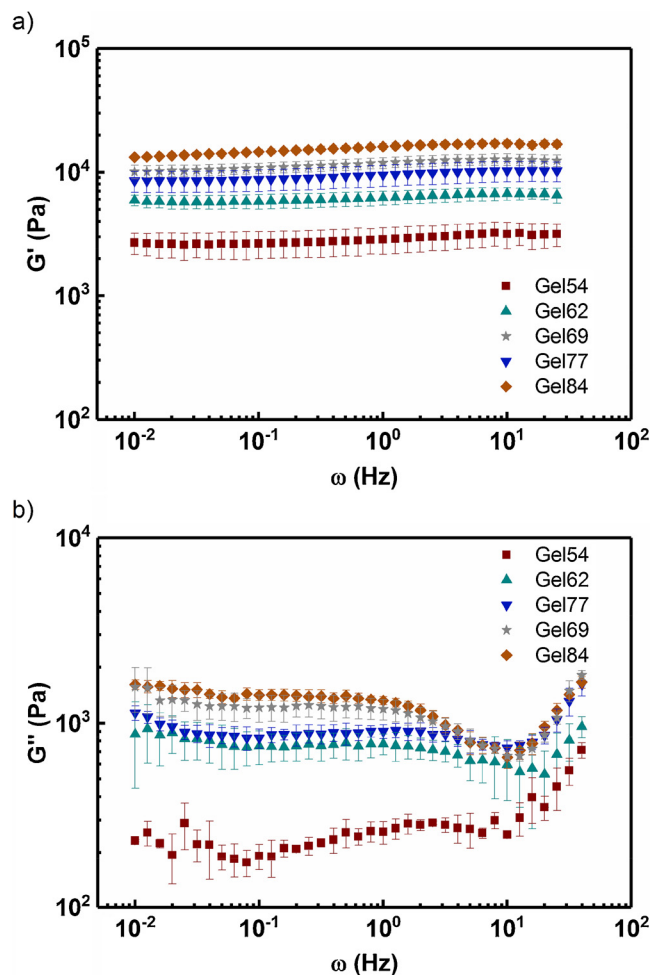


Fig. 3. Spectra of the reinforced ionogels obtained by dynamic frequency sweep tests. (a) Elastic moduli (G') and (b) loss moduli (G'').

Table 2

Values of α , G_0 and R^2 for the correlation of $G' \sim \omega^\alpha$, and the relation between G' and G'' mean values for the formulated ionogels.

Ionogel	α	G_0 (Pa)	R^2	$(G'/G'')_{\text{mean}}$
Gel54	0.027 ± 0.002	2887 ± 1	0.869	10.8 ± 2.3
Gel62	0.022 ± 0.001	6249 ± 1	0.892	8.41 ± 1.6
Gel69	0.034 ± 0.001	11730 ± 1	0.959	10.4 ± 3.5
Gel77	0.030 ± 0.001	9490 ± 1	0.966	10.6 ± 1.5
Gel84	0.037 ± 0.001	15831 ± 1	0.967	12.8 ± 5.1

At the same frequency, as the DD of the reinforcement material increased, both the elastic and loss moduli increased (Fig. 3a). Gel84 showed the greatest elastic behavior (~ 10.6 kPa), e.g., for $\omega = 1$ Hz, the mean value of G' for Gel84 was 5.6 times greater than that of Gel54 (2.8 kPa). Similarly, the mean values of G' for Gel77, Gel69 and Gel62 were 3.3, 4 and 2.1 times greater than the value of Gel54, respectively. Therefore, the reinforcement material had an influence on the rheological properties of the ionogels, i.e., the materials acquired a more solid-like behavior by increasing the DD of the reinforcement material. Note that the G' values for Gel69 and Gel 77 overlapped, and their elastic behavior was similar.

Furthermore, the mean G'' also increased as the DD of the reinforcement material increased when the frequency changed from 0.01 to 1 Hz, except in the case of Gel69, which showed loss behavior similar to Gel84 and Gel77 (Fig. 3b). These results, together with the similar elastic behavior, indicated that a DD of 69 to 77% did not influence the rheological properties of the ionogel. Gel54 exhibited the most loss behavior; for $\omega = 1$ Hz, the G'' for Gel84 was 5.1 times greater than that of Gel54 (0.26 kPa). However, at frequencies ranging from 1 to 50 Hz, all loss moduli of the formulated ionogels had the tendency to overlap (at approximately 15 Hz), i.e. they had the same viscous behavior. At frequencies greater than 15 Hz, in all cases, the values of G'' increased to meet with G' in the leathery region.

The G_0 of the formulated ionogels improved when the DD of the chitosan increased (Table 2), except in the case of the G_0 of Gel69, whose value was greater than that of Gel77. However, as mentioned previously, for DDs ranging from 69 to 77%, there were no significant effects on the rheological properties. Gel84 was the ionogel with a substantial amount of elastic energy stored in the unit volume of the network, which was 81% greater than the value of Gel54.

The possible explanation for these rheological results is that chitosan with a greater DD, and therefore, a greater proportion of amine groups, has more interactions with the matrix than chitosan with a lower DD of the reinforcement material. This behavior is possible because the particles tend to restrict the movement of the matrix in the vicinity of each particle due to the hydrogen bonds between chitosan and dissolved cellulose (Li & Zhu, 2018). The greater the amount of Glc units, the greater the availability to form hydrogen bonds; thus, there is a major interaction between cellulose and chitosan (Jeffrey & Saenger, 1991). This plausible mechanism of interactions is shown in Fig. 4a, together with optical microscopy images of the homogeneity distribution of the chitosan in the cellulosic ionogel (Fig. 4b).

The ionogels demonstrated a strong dependence of the complex viscosity (η^*) on the applied frequency (Fig. 5). The η^* of the ionogels increased ≥ 84 times when the frequency changed from 0.1 to 10 Hz. This variation indicated that the obtained ionogels showed shear-thinning behavior (Larson, 1999).

The η^* increased as the DD of the chitosan raised in the ionogel.

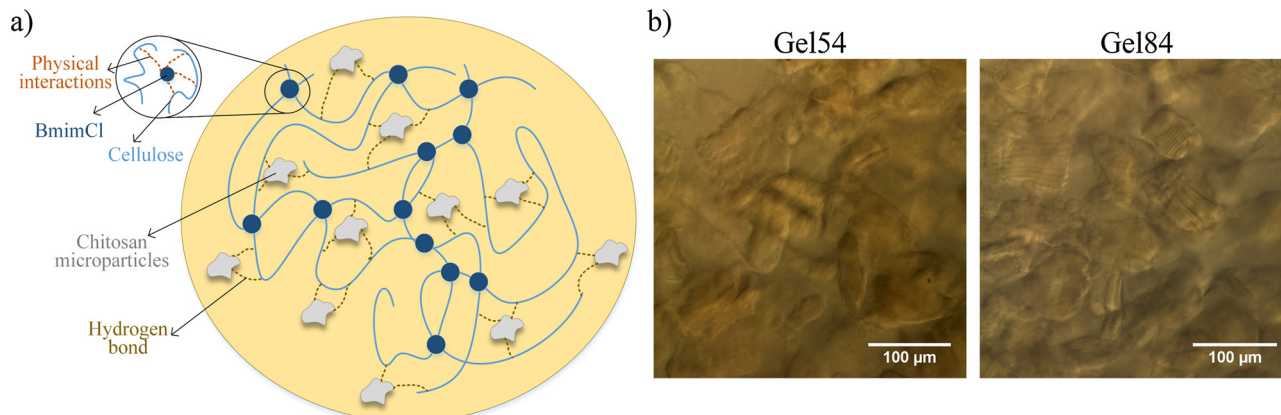


Fig. 4. (a) A schematic of plausible interactions between components in the ionogel and (b) optical microscopy images of Gel54 and Gel84.

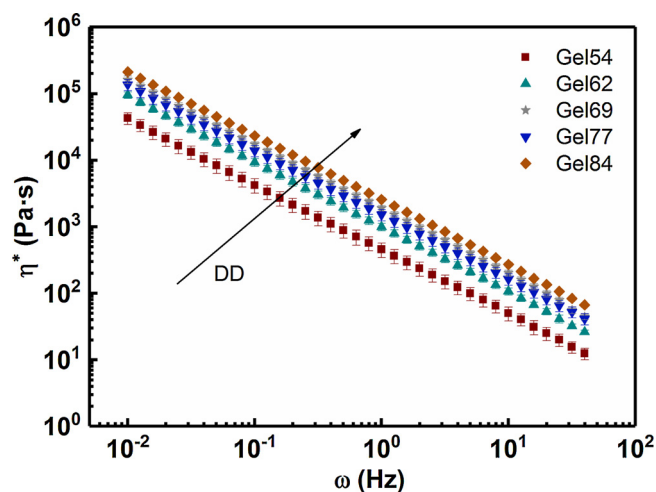


Fig. 5. Complex viscosity (η^*) of the reinforced ionogels.

Therefore, Gel84 showed the greatest resistance to deformation in relation to the rest of the ionogels. For a frequency of 1 Hz, the complex viscosity values of Gel54, Gel62 and Gel78 were 82, 61 and 41%, respectively, which were less than that of Gel84. In analogy with the apparent viscosity for the viscoelastic fluids, the obtained data were fitted to the power-law model as follows:

$$\eta^* = q \cdot \omega^{p-1} \quad (6)$$

where q (Pa s^p) and p are constant parameters of the fit. The parameter q provides the resistance to deformation at frequencies near zero, and p is a measure of the slope of the $\log\text{-}\eta^*$ vs. $\log\text{-}\omega$. The parameters of the complex viscosity fit are shown in Table 3.

The q values confirmed that as the DD of the reinforcement material increased the resistance to deformation increased, with an 82% difference between the values for Gel54 and Gel84. Similar to the results obtained for G' and G'' , the complex viscosity and parameter fit showed the clear influence of the DD in the interactions between the matrix and the reinforcement material of the ionogel.

Similar values of the obtained moduli (G' : 2.5–10.6 kPa, G'' : 0.15–1.7 kPa) were found for other gels with applications as medical devices. Quah, Smith, Preston, Laughlin, and Bhatia (2018) developed an alginate hydrogel that was used as a wound dressing. The alginate hydrogel presented values of $G' \sim 8$ kPa and G'' between 0.12 and 1 kPa. Wang et al. (2017) developed keratin hydrogels with a G' of ~ 5 kPa and G'' ranging from 1 to 1.1 kPa (for 20% keratin), with potential use for wound healing. Similarly, Chen et al. (2017) developed a composite hydrogel dressing with G' values between 4 and 11 kPa and G'' values ranging from 0.6 to 1 kPa for 40 mg/mL gelatin microspheres. Furthermore, ionogels formulated by Trivedi, Rao, and Kumar (2014) and Sharma et al. (2015), which demonstrated solid-like behavior of physical ionogels with agarose-chitosan and agar, respectively, had similar results compared with the results obtained in this study.

Therefore, the ionogels developed in this study possess the necessary rheological properties for use as gel scaffolds for wound management. Gel84 demonstrated the best viscoelastic properties to achieve solid and strong scaffolds.

Table 3
Parameters of the power-law model of the complex viscosity of the ionogels.

Ionogel	q (Pa s^p)	p	R^2
Gel54	462 ± 1	0.028 ± 0.002	0.999
Gel62	995 ± 1	0.018 ± 0.002	0.999
Gel69	1847 ± 1	0.026 ± 0.003	0.999
Gel78	1514 ± 1	0.029 ± 0.001	0.999
Gel84	2513 ± 1	0.034 ± 0.002	0.999

3.3. Thermal properties of the ionogels

Thermal transitions of the ionogels were analyzed to investigate the influence of the reinforcement material. There are two thermal transitions shown in the thermograms in Fig. 6 as follows: glass transition and melting.

The beginning of the glass transition region for all ionogels was close to -109 °C, and the melting point (T_m) for all ionogels was approximately 40 °C. The glass transition temperatures (T_g) of Gel54, Gel62, Gel69, Gel78 and Gel84 were -98.9 ± 0.5 , -98.3 ± 0.1 , -97.9 ± 0.8 , -98.5 ± 0.4 , and -98.6 ± 0.3 °C, respectively. The difference in these values was not significant; consequently, there was no influence of the reinforcement materials on the thermal properties of the obtained ionogels. BmimCl and chitosan have glass transition temperatures of $\sim (-69)$ °C (Fredlake, Crosthwaite, Hert, Aki, & Brennecke, 2004) and ~ 150 °C (Dong, Ruan, Wang, Zhao, & Bi, 2004), respectively. The obtained T_g values of the ionogels were less than that of BmimCl. This could be attributed to the water absorbed by the ionogels during the gelation step in the formulation of the ionogels since if the ionogels absorb 9% (molar) water, the T_g could be reduced up to 48 °C (Sippel et al., 2016).

Thermoreversibility testing was performed to verify that the interactions that maintained the gel-like structure were physical, consistent with the rheological properties (Fig. S3). Additionally, to check that the interactions of the reinforcement were with the dissolved cellulose, BmimCl was removed from the ionogels using water (Markstedt et al., 2014; Wang, Sun et al., 2018), and the well-structured morphology of the material was maintained (Fig. S4).

These thermal properties could allow the processing of ionogels to obtain materials by promising new techniques, such as 3D printing. Energy consumption in 3D printing could be reduced because of the low melting temperature of the ionogels (40 °C compared to 180 °C for PLA (Grémare et al., 2018), which is a standard 3D ink). Additionally, the rheological properties shown in this study were within the values reported for gel structures obtained by 3D printing: G' : 5–10.5 kPa and G'' : 0.2–3.5 kPa (Díaz et al., 2019).

4. Conclusions

The cellulosic ionogels reinforced with chitosan with DDs between 54 and 84% were successfully developed. The rheological properties of the ionogels revealed a strong dependence with the DD of chitosan. The elastic and loss behavior, as well as the gel strength and the complex viscosity, generally increased as the DD increased because of the physical interactions between chitosan and cellulose in the ionogel (strong physical gels). Gel84 exhibited the greatest strength (81% greater than that of Gel54), with elastic and loss moduli values of 5.6 and 5.1 times greater than the values of Gel54, respectively.

In all cases, the thermal properties did not depend on the DD of chitosan since the glass transition temperature was -98 °C and the melting temperature was 40 °C. In addition, the ionogels were shown to be thermoreversible.

These results provide the preliminary foundation of the rheological and thermal properties for future studies of new biocompatible ionogels reinforced with chitosan for potential use as gel scaffolds for wound management.

Acknowledgments

This work was performed thanks to the financial support of the “Comunidad Autónoma de Madrid” (Spain) under the funded project S2013/MAE-2800, and of the “Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades” under the funded project CTQ2017-88623-R.

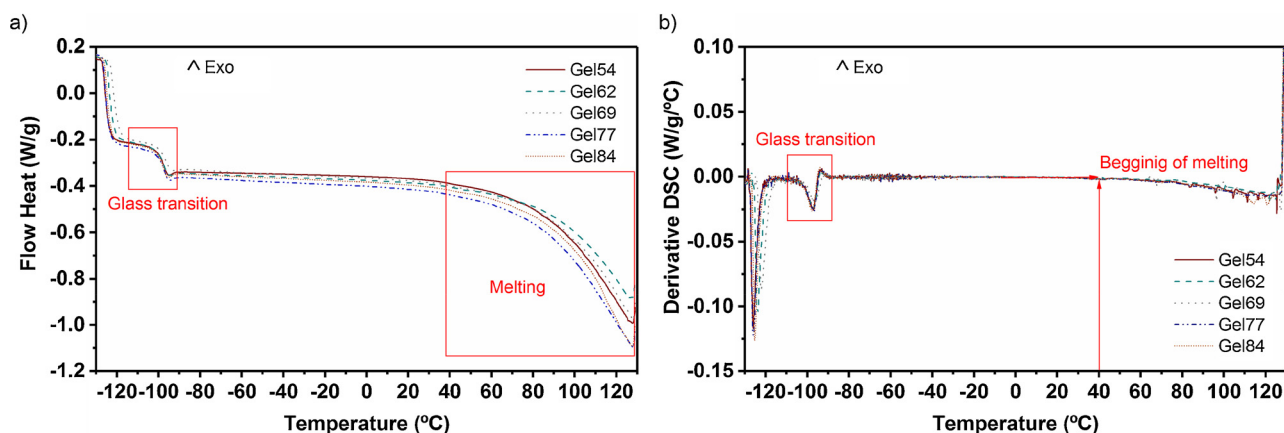


Fig. 6. (a) DSC thermograms and (b) derivative DSC of the reinforced ionogels.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.041>.

References

- ASTM-E1356. Standard test method for assignment of the glass transition temperatures by differential scanning calorimetry.
- Barnes, H. A. (2000). *A handbook of elementary rheology*. Wales, U. K: University of Wales Aberystwyth.
- Bothwell, K. M., & Marr, P. C. (2017). Taming the base catalyzed sol–Gel reaction: Basic ionic liquid gels of SiO₂ and TiO₂. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(2), 1260–1263.
- Brevet, D., Jouannin, C., Tourné-Péteilh, C., Devoisselle, J.-M., Vioux, A., & Viau, L. (2016). Self-encapsulation of a drug-containing ionic liquid into mesoporous silica monoliths or nanoparticles by a sol–gel process. *RSC Advances*, 6(86), 82916–82923.
- Chang, K. L. B., Tsai, G., Lee, J., & Fu, W.-R. (1997). Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Research*, 303(3), 327–332.
- Chen, H., Xing, X., Tan, H., Jia, Y., Zhou, T., Chen, Y., et al. (2017). Covalently antibacterial alginate-chitosan hydrogel dressing integrated gelatin microspheres containing tetracycline hydrochloride for wound healing. *Materials Science and Engineering C*, 70, 287–295.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36(8), 981–1014.
- Diañez, I., Gallegos, C., Brito-de la Fuente, E., Martínez, I., Valencia, C., Sánchez, M., et al. (2019). 3D printing in situ gelification of κ -carrageenan solutions: Effect of printing variables on the rheological response. *Food Hydrocolloids*, 87, 321–330.
- Dong, Y., Ruan, Y., Wang, H., Zhao, Y., & Bi, D. (2004). Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques. *Journal of Applied Polymer Science*, 93(4), 1553–1558.
- Fan, L., Wei, S., Li, S., Li, Q., & Lu, Y. (2018). Recent progress of the solid-state electrolytes for high-energy metal-based batteries. *Advanced Energy Materials*, 8(11), 1702657.
- Fangbing, L., Wang, C., Zhu, P., & Zhang, C. (2014). Characterization of chitosan microparticles reinforced cellulose biocomposite sponges regenerated from ionic liquid. *Cellulose*, 21(6), 4405–4418.
- Fredlake, C. P., Crosthwaite, J. M., Hert, D. G., Aki, S. N., & Brennecke, J. F. (2004). Thermophysical properties of imidazolium-based ionic liquids. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 49(4), 954–964.
- Fu, H., Wang, Y., Chen, W., & Xiao, J. (2015). Reinforcement of waterborne polyurethane with chitosan-modified halloysite nanotubes. *Applied Surface Science*, 346, 372–378.
- Ghorbanizamani, F., & Timur, S. (2017). Ionic Liquids from biocompatibility and electrochemical aspects toward applying in biosensing devices. *Analytical Chemistry*, 90(1), 640–648.
- Gil-González, N., Akyazi, T., Castaño, E., Benito-Lopez, F., & Morant-Miñana, M. (2017). Elucidating the role of the ionic liquids in the actuation behavior of thermo-responsive ionogels. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 260, 380–387.
- Grémare, A., Guduric, V., Bareille, R., Heroguez, V., Latour, S., L'heureux, N., et al. (2018). Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(4), 887–894.
- Jeffrey, G. A., & Saenger, W. (1991). *Hydrogen bonding in biological structures*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Larson, R. G. (1999). *The structure and rheology of complex fluids*. New York, USA: Oxford University Press.
- Le Bideau, J., Viau, L., & Vioux, A. (2011). Ionogels, ionic liquid based hybrid materials. *Chemical Society Reviews*, 40(2), 907–925.
- Li, G., & Zhu, F. (2018). Rheological properties in relation to molecular structure of quinoa starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 767–775.
- Markstedt, K., Sundberg, J., & Gatenholm, P. (2014). 3d bioprinting of cellulose structures from an ionic liquid. *3D Printing and Additive Manufacturing*, 1(3), 115–121.
- Marr, P. C., & Marr, A. C. (2016). Ionic liquid gel materials: Applications in green and sustainable chemistry. *Green Chemistry*, 18(1), 105–128.
- Niroomand, F., Khosravani, A., & Younesi, H. (2016). Fabrication and properties of cellulose-nanochitosan biocomposite film using ionic liquid. *Cellulose*, 23(2), 1311–1324.
- Peng, H., Wang, S., Xu, H., & Dai, G. (2018). Preparations, properties, and formation mechanism of novel cellulose hydrogel membrane based on ionic liquid. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(7), 45488.
- Quah, S. P., Smith, A. J., Preston, A. N., Laughlin, S. T., & Bhatia, S. R. (2018). Large-area alginate/PEO-PPO-PEO hydrogels with thermoreversible rheology at physiological temperatures. *Polymer*, 135, 171–177.
- Ranjan, R., Rawat, K., & Bohidar, H. (2017). Folic acid supramolecular ionogels. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(34), 22934–22945.
- Ross-Murphy, S. B. (1995). Structure–property relationships in food biopolymer gels and solutions. *Journal of Rheology*, 39(6), 1451–1463.
- Seo, D. G., & Moon, H. C. (2018). Mechanically robust, highly ionic conductive gels based on random copolymers for bending durable electrochemical devices. *Advanced Functional Materials*, 28(14), 1706948.
- Sharma, P., & Gupta, M. (2016). 1, 3, 5-Trimethylpyrazolium chloride based ionogel as an efficient and reusable heterogeneous catalyst for the synthesis of benzimidazoles. *Journal of Chemical Sciences*, 128(1), 61–65.
- Sharma, A., Rawat, K., Solanki, P. R., Aswal, V., Kohlbrecher, J., & Bohidar, H. (2015). Internal structure and thermo-viscoelastic properties of agar ionogels. *Carbohydrate Polymers*, 134, 617–626.
- Sippel, P., Dietrich, V., Reuter, D., Aumüller, M., Lunkenheimer, P., Loidl, A., et al. (2016). Impact of water on the charge transport of a glass-forming ionic liquid. *Journal of Molecular Liquids*, 223, 635–642.
- Sun, G., Zhang, X., Bao, Z., Lang, X., Zhou, Z., Li, Y., et al. (2018). Reinforcement of thermoplastic chitosan hydrogel using chitin whiskers optimized with response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 189, 280–288.
- Takada, A., & Kadokawa, J.-I. (2015). Fabrication and characterization of polysaccharide ion gels with ionic liquids and their further conversion into value-added sustainable materials. *Biomolecules*, 5(1), 244–262.
- Thiemann, S., Sachnov, S. J., Pettersson, F., Bollström, R., Österbacka, R., Wasserscheid, P., et al. (2014). Cellulose-based ionogels for paper electronics. *Advanced Functional Materials*, 24(5), 625–634.
- Tran, C. D., Duri, S., Delneri, A., & Franko, M. (2013). Chitosan-cellulose composite materials: Preparation, characterization and application for removal of microcystin. *Journal of Hazardous Materials*, 252, 355–366.
- Tran, C., Duri, S., & Harkins, A. L. (2013). Recyclable synthesis, characterization, and antimicrobial activity of chitosan-based polysaccharide composite materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101(8), 2248–2257.
- Trivedi, T. J., Rao, K. S., & Kumar, A. (2014). Facile preparation of agarose–chitosan hybrid materials and nanocomposite ionogels using an ionic liquid via dissolution, regeneration and sol–gel transition. *Green Chemistry*, 16(1), 320–330.
- Villar-Chavero, M. M., Domínguez, J. C., Alonso, M. V., Oliet, M., & Rodríguez, F. (2018). Thermal and kinetics of the degradation of chitosan with different deacetylation degrees under oxidizing atmosphere. *Thermochemica Acta*, 670, 18–26.
- Vioux, A., Viau, L., Volland, S., & Le Bideau, J. (2010). Use of ionic liquids in sol-gel; ionogels and applications. *Comptes Rendus Chimie*, 13(1), 242–255.
- Vittoz, P.-F., El Siblani, H., Bruma, A., Rigaud, B., Sauvage, X., Fernandez, C., et al. (2018). Insight in the alginate Pd-Ionogels. Application to the Tsuji–Trost reaction. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(4), 5192–5197.
- Wang, W., Bo, S., Li, S., & Qin, W. (1991). Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13(5), 281–285.
- Wang, J., Hao, S., Luo, T., Cheng, Z., Li, W., Gao, F., et al. (2017). Feather keratin hydrogel for wound repair: Preparation, healing effect and biocompatibility evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 149, 341–350.
- Wang, Q., Sun, J., Yao, Q., Ji, C., Liu, J., & Zhu, Q. (2018). 3D printing with cellulose

- materials. *Cellulose*, 25(8), 4275–4301.
- Wang, Y., Yu, Q., Bai, Y., Zhang, L., Zhou, F., Liu, W., et al. (2018). Self-constraint gel lubricants with high phase transition temperature. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(11), 15801–15810.
- Zhang, J., Wu, J., Yu, J., Zhang, X., He, J., & Zhang, J. (2017). Application of ionic liquids for dissolving cellulose and fabricating cellulose-based materials: State of the art and future trends. *Materials Chemistry Frontiers*, 1(7), 1273–1290.
- Zhang, S., Wang, F., Peng, H., Yan, J., & Pan, G. (2018). Flexible highly sensitive pressure sensor based on ionic liquid gel film. *ACS Omega*, 3(3), 3014–3021.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Tuning the rheological properties of cellulosic ionogels reinforced with chitosan: the role of the deacetylation degree

M. Mar Villar-Chavero*, Juan C. Domínguez, M. Virginia Alonso, Mercedes Oliet, Francisco Rodriguez

Chemical Engineering and Materials Department, Complutense University of Madrid, Av. Complutense S/N, 28040, Madrid, Spain

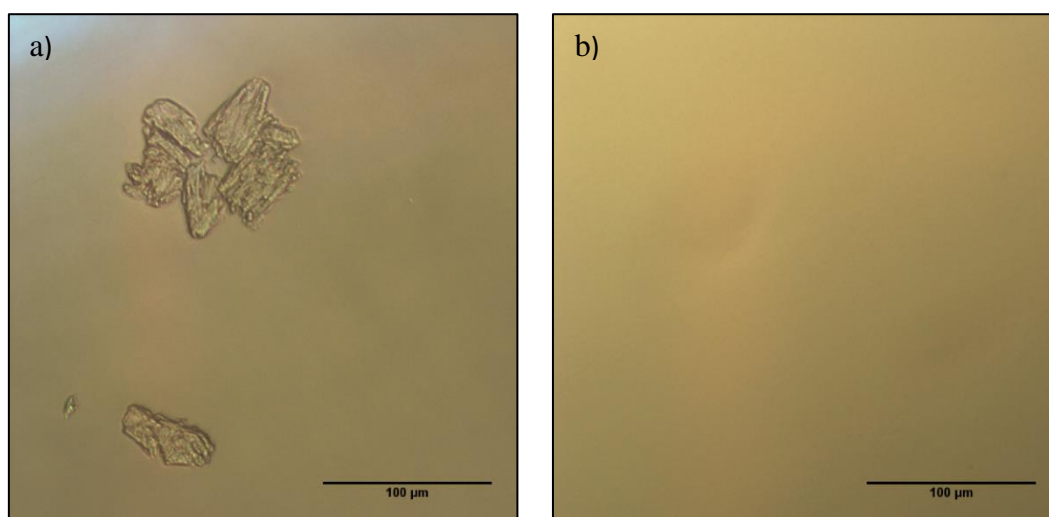


Figure S1. Optical microscopy images at 0 h (a) and 6 h (b) of cellulose dissolution in BmimCl.

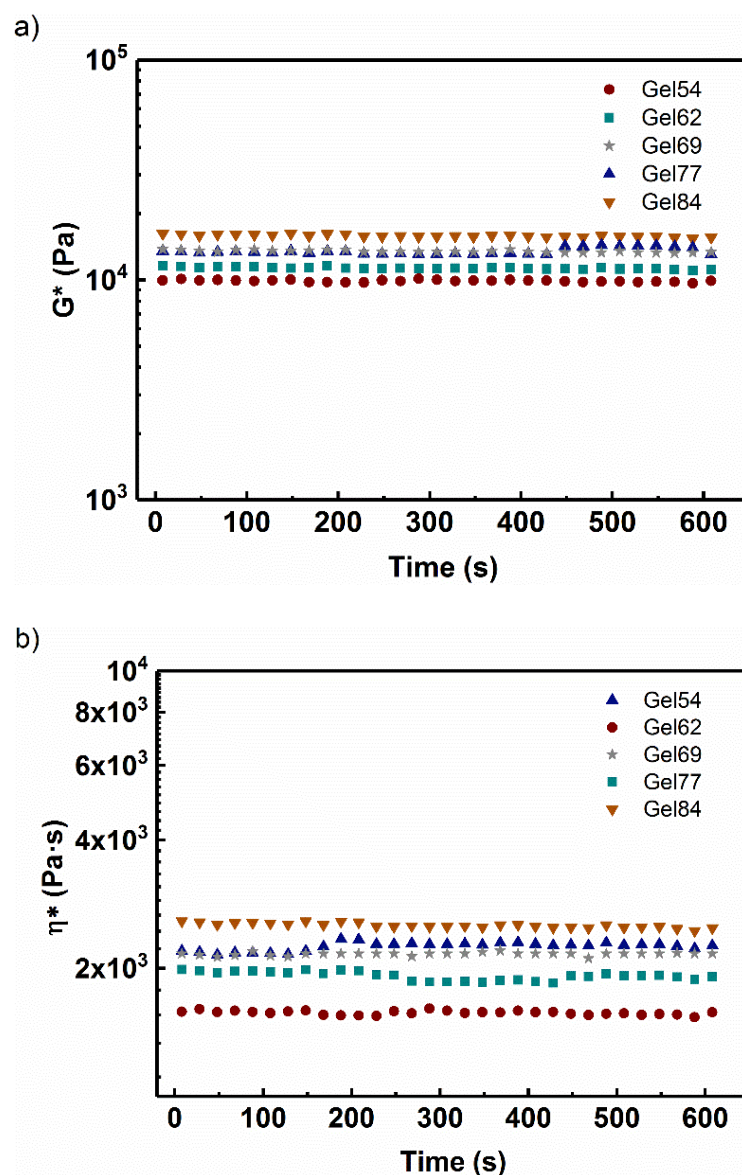


Figure S2. Time sweep test of the formulated ionogels: (a) complex modulus (G^*) and (b) complex viscosity (η^*).

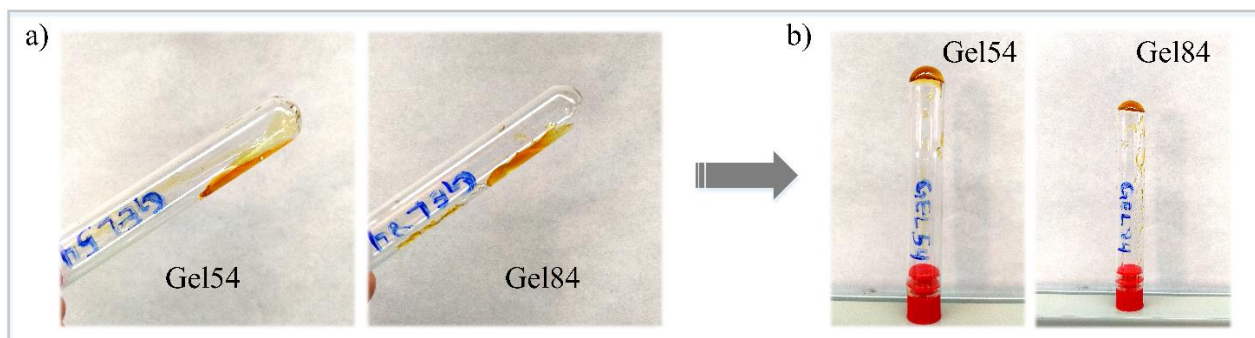


Figure S3. Thermoreversibility test: (a) melted ionogels and (b) regelation of ionogels.

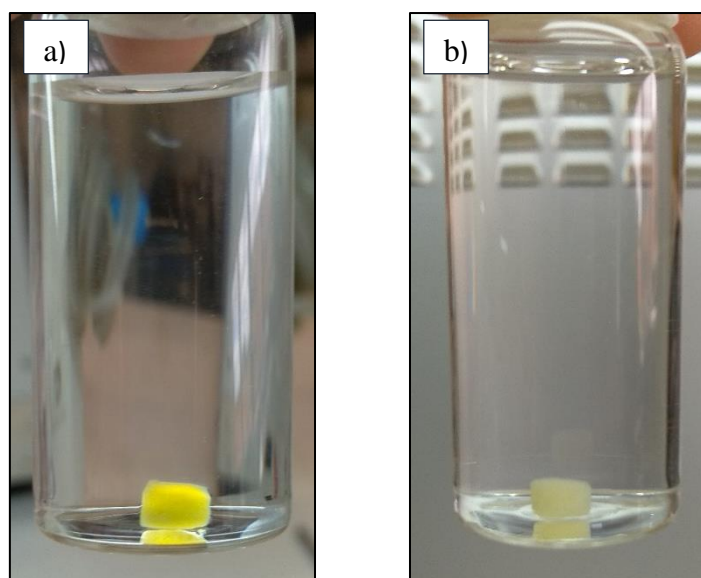


Figure S4. Images of Gel84 immersed in water (a) and the hydrogel formed by the elimination of BmimCl using water (b).

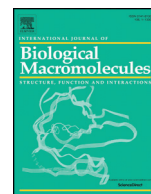
PUBLICACIÓN III

“Viscoelastic properties of physical cellulosic bionogels of cholinium lysinate”

M. Mar Villar-Chavero, Juan C. Domínguez, M. Virginia Alonso, Victoria Rigual,
Mercedes Oliet, y Francisco Rodríguez

International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 133, 262-269





Viscoelastic properties of physical cellulosic bionogels of cholinium lysinate

M. Mar Villar-Chavero ^{*}, Juan C. Domínguez, M. Virginia Alonso, Victoria Rigual, Mercedes Oliet, Francisco Rodriguez

Chemical Engineering and Materials Department, Complutense University of Madrid, Av. Complutense S/N, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 March 2019

Received in revised form 8 April 2019

Accepted 9 April 2019

Available online 11 April 2019

Keywords:

Bionogel

Ionogel

Cellulose

Cholinium lysinate

Rheology

ABSTRACT

Novel ionogels with different cellulose contents, namely, 0.5, 1, 1.5 and 2 wt%, were formulated with cholinium lysinate (ChLys), and the rheological properties were evaluated at 3 and 7 days postgelation. Because of the biobased compounds contained in these ionogels, in this work, they are denoted as bionogels. These materials have great potential to yield functional biomaterials for use in the medical/pharmacological sector. Some knowledge of how cellulose is dissolved in ChLys was necessary to formulate the bionogels. The dissolution time was studied for each bionogel, with the dissolution times being 3, 4, 4.5, and 6.5 h for 0.5, 1, 1.5, and 2% cellulose, respectively. The bionogel with a 2% cellulose load had the highest rheological properties, i.e. elastic modulus (G'), loss modulus (G'') and complex viscosity (η^*), on the studied postgelation days: G' (3 days): 0.7–50 kPa, G' (7 days): 1–100 kPa, G'' (3 days): 0.1–10 kPa, and G'' (7 days): 0.2–20 kPa, η^* (3 days): 0.2–200 kPa s and η^* (7 days): 0.4–300 kPa s. The postgelation time is an important parameter in the formulation of bionogels, since at 3 days postgelation, the networks continued to be constituted. Regarding classification, these bionogels were weak physical gels.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, third-generation ionic liquids have acquired great interest due to their high biodegradability and low toxicity [1]. Within this generation are cholinium amino acid ionic liquids (ChAAILs), which are composed of a cholinium cation (*N,N,N*-trimethylethanolammonium) and an amino acid anion [2,3]. Choline is an essential micronutrient that participates in different biological functions; therefore, it is a biocompatible and nontoxic biocompound [4]. Amino acids are biomolecules obtained from natural and renewable raw materials and are one of the most abundant classes of organic compounds in nature [2,5]. Therefore, ChAAILs are considered biodegradable, biocompatible, nontoxic, and more cost-effective relative to conventional ionic liquids [6,7]. The application of ChAAILs is focused on the industrial (e.g., green catalysis, CO₂ capture), biomass processing (for biomass pretreatment), and pharmaceutical/medical chemistry (e.g., biosensors, drug delivery) sectors [2,3]. For applications in pharmaceutical/medical chemistry, the study and development of new materials has acquired much relevance in recent years [1].

Ionogels are gel materials comprised of two components, an ionic liquid as the dispersed phase and a continuous solid phase consisting

of organic (e.g., biopolymers), inorganic (e.g., metals, ceramics), or hybrid organic-inorganic compounds [8,9]. The nature of the interactions between the ionic liquid and the solid phase can be physical or chemical. Physical interactions are noncovalent, such as hydrogen bonds, π - π interactions or van der Waals forces; meanwhile, chemical interactions are covalent bonds and, therefore, form irreversible 3D networks [9]. Depending on these types of interactions, ionogels exhibit different thermal and viscoelastic properties [10]. Cellulose, a polysaccharide consisting of glucose units linked through β -(1–4) glycosidic linkages, is a perfect candidate for the solid phase of ionogels. The solubility of cellulose in conventional ionic liquids and, therefore, in the formation of cellulosic ionogels is well-known and has been previously reported [11–14]. This solubilization lies in the ability of the conventional ionic liquid to form hydrogen bonds with cellulose, i.e., through physical interactions [15]. The same ability has been found by Scarpellini, Ortolani, Nucara, Baldassarre, Missori, Fastampa and Caminiti [16] for ChAAILs, and they proposed an interaction mechanism between cellulose and cholinium glycinate (ChGly) based on hydrogen bonds between NH₂⁺ and COO[−] of glycine and —OH of cellulose [16]. For this reason, novel biobased ChAAILs-cellulose ionogels can be developed, and are proposed to be denoted as bionogels in the present work.

The study of viscoelastic properties is of great importance for gel-like materials due to the fact that the mechanical properties of these materials are determined, and it is possible to evaluate the mechanisms

^{*} Corresponding author.

E-mail address: mdm.villar@ucm.es (M.M. Villar-Chavero).

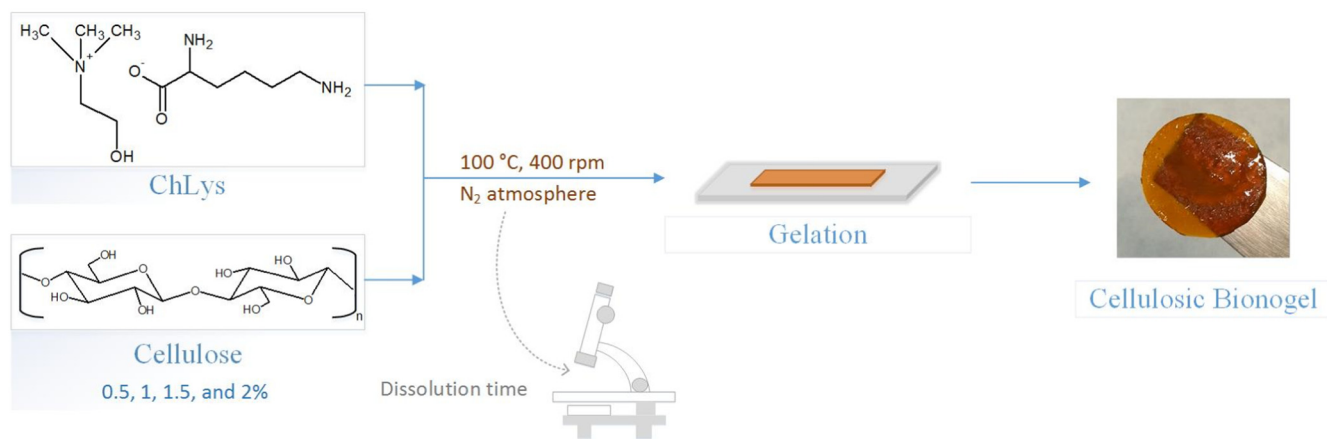


Fig. 1. Schematic of the process followed to obtain the cellulosic bionogels.

and factors involved in the gelation process [17]. Moreover, bionogels formulated with ChAAILs have not been developed or rheologically characterized to date.

The aim of this research is to formulate novel cellulosic bionogels containing cholinium lysinate (ChLys), a ChAAILs, and to study the influence of the cellulose load and the evolution over time on their

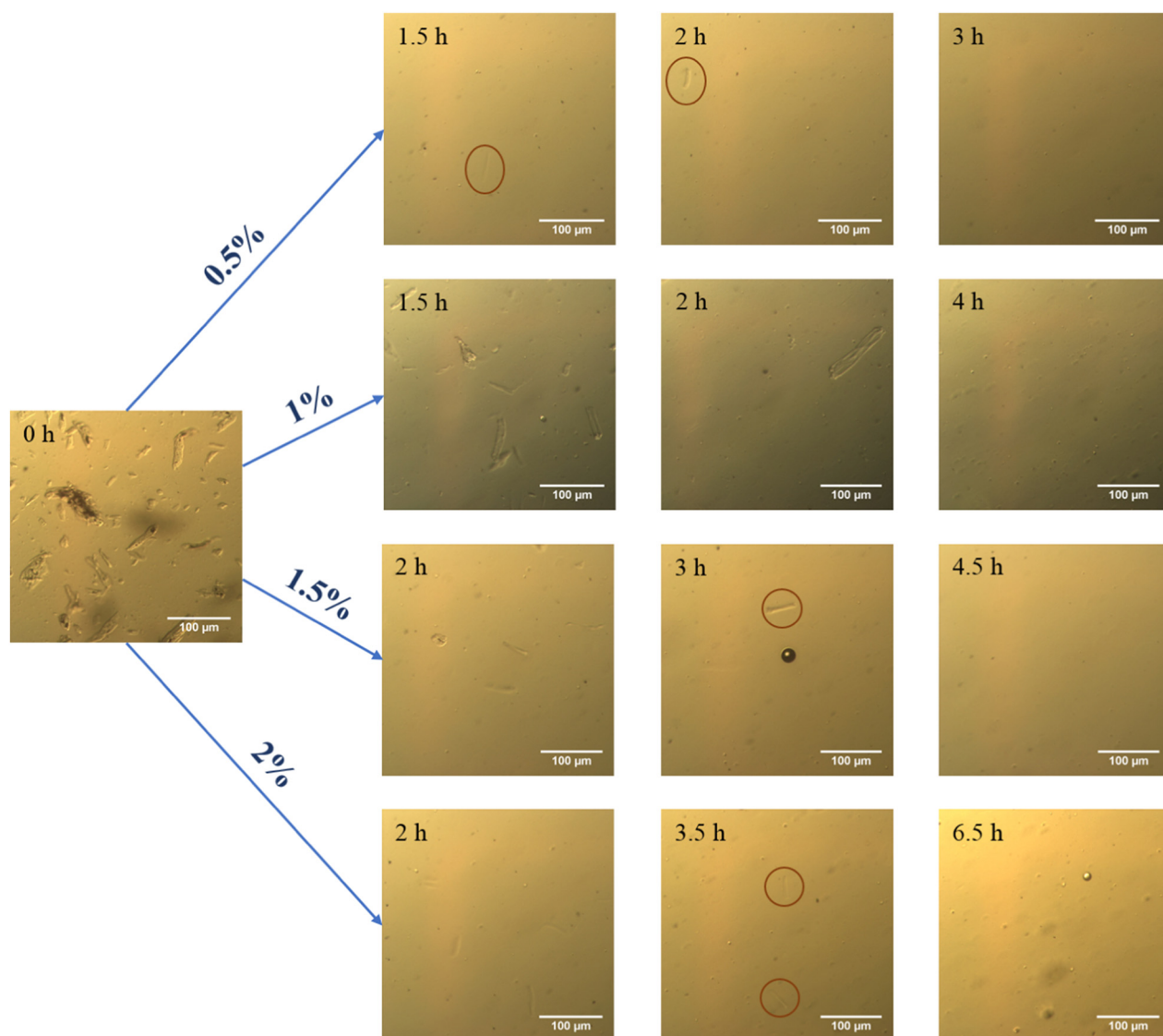


Fig. 2. Microscope images of the dissolution of cellulose in ChLys at different concentrations and times. Certain particles have been marked with red circles to denote their presence in the microscope images.

rheological properties. In this way, nontoxic, biodegradable, and biocompatible bionogels can be developed for the production of functional biomaterials with potential uses in the medical/pharmaceutical sector.

2. Experimental section

2.1. Materials

The materials used for the formulation of the bionogels were ChLys with a purity of 90%, acquired from Iolitec GmbH, and Avicel® PH-101 microcrystalline cellulose with a degree of polymerization of 230, obtained from Sigma-Aldrich. Both compounds were dried in a vacuum oven for 12 h at 40 °C before formulation of the bionogels.

2.2. Dissolution of cellulose in ChLys

Microcrystalline cellulose was dissolved in ChLys under magnetic stirring (400 rpm) at 100 °C under an N₂ atmosphere. The percentages of cellulose added to obtain each bionogel were 0.5, 1, 1.5, and 2 wt%. The cellulose was added in one dosage, excepting the concentrations of 1.5 and 2%, for which the cellulose was introduced in two equivalent doses to avoid aggregates and improve the dissolution process. Aliquots were taken every 30 min and visualized under a Carl Zeiss Axio Scope A1 microscope equipped with a Zeiss AxioCam ICc1 to determine the dissolution time for each cellulose concentration.

2.3. Formulation of bionogels

The formulation of the bionogels is schematized in Fig. 1. This formulation was conducted under the same conditions used for the dissolution of cellulose (100 °C, 400 rpm and inert atmosphere). Fully dissolved cellulose solutions were poured into a steel plate covered with PET film at room temperature and kept until to gelation. After 3 and 7 days, samples of 25 mm in diameter were cut to evaluate the rheological properties of the bionogels.

2.4. Rheological characterization

Rheological characterization was conducted with an ARES rheometer (TA Instruments) under isothermal conditions, using serrated parallel plates of 25 mm in diameter and a gap of 2 mm. The linear viscoelastic region of the bionogels was determined through a strain sweep test. These tests were conducted in the strain range of 0.007 to 0.3% at 25 °C and 50 Hz (the maximum frequency used in the dynamic

frequency tests). Previously, the stability of the bionogels was checked by time sweep tests (data not shown). The rheological spectra were generated from dynamic frequency sweep tests conducted from 0.01 to 50 Hz with a fixed strain of 0.01% (within the linear viscoelastic region) at 25 °C. These spectra were obtained at 3 and 7 days postgelation (from the day the bionogel was developed) to evaluate the influence of time on the viscoelastic properties of the bionogels.

2.5. Attenuated total reflectance Fourier Transform infrared (FTIR/ATR) analyses

Attenuated total reflectance Fourier Transform infrared (FTIR/ATR) spectra of the cellulose, ChLys, and the bionogels were recorded to test the type of interaction between cellulose and ChLys. A Jasco 4700 spectrometer with a Golden Gate TM diamond accessory Specac 10542 was employed. FTIR/ATR spectra were measured between 4000 and 800 cm⁻¹, using 64 scans and a resolution of 2 cm⁻¹.

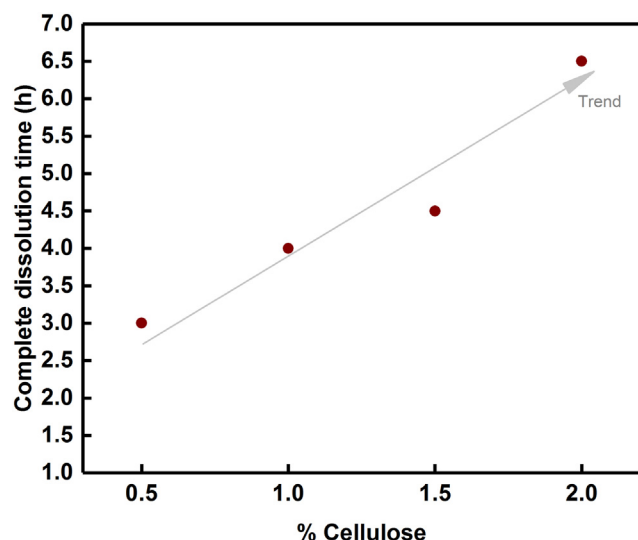


Fig. 3. Dissolution times of cellulose in ChLys at different cellulose concentrations.

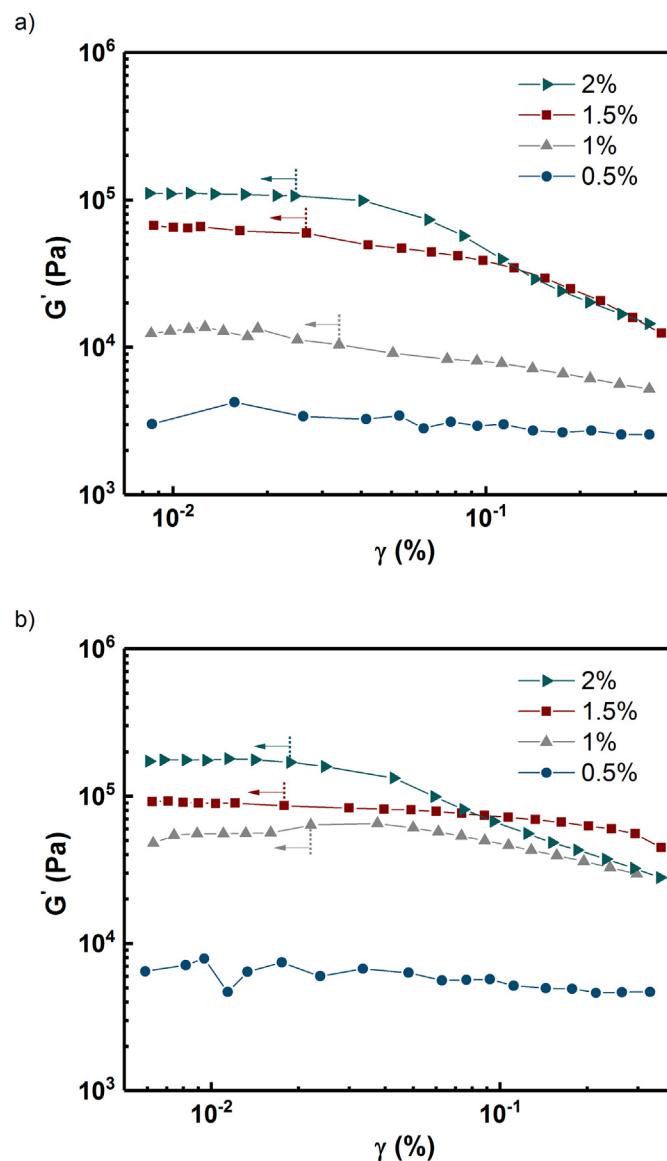


Fig. 4. Strain sweep tests for all bionogels at 50 Hz and 25 °C at a) 3 days and b) 7 days postgelation.

3. Results and discussion

3.1. Dissolution time of cellulose in ChLys

Some of the images acquired to determine the dissolution times of each concentration of cellulose in ChLys are shown in Fig. 2.

Cellulose microparticles could be observed at short times of dissolution (1.5 and 3 h) for all cellulose concentrations. For all samples, the amount of cellulose microparticles observed decreased as the time increased until complete dissolution was reached (Fig. 2). This behavior and the capability of ChLys to dissolve cellulose are also found in the literature [18]. The dissolution times for the studied concentrations are shown in Fig. 3. The complete dissolution times became longer as the cellulose load was increased. This effect was because the viscosity was greater when the amount of dissolved cellulose was increased, and therefore, the dissolution required more time to complete [19].

3.2. Linear viscoelastic region of the bionogels (LVR)

The linear viscoelastic regions (LVRs) associated with each bionogel were determined through strain sweep tests. The results obtained at 3 and 7 days postgelation are shown in Fig. 4.

In the LVR, the elastic modulus (G') is almost constant throughout variation of the strain. In this region, the internal structure network of the material does not change with applied strain. The limits of the LVRs (γ_c) for the bionogels with cellulose concentrations of 1, 1.5, and 2% at 3 days postgelation were 0.034, 0.027, and 0.024%, respectively. Thus, the bionogels with 1.5 and 2% cellulose exhibited similar γ_c values, which were lower than that of the 1% cellulose bionogel. For the bionogel with 0.5% cellulose, the γ_c value was not observed within the studied range. This means that the bionogel with 0.5% cellulose presented the most deformability (with deformability understood as the ability to accept high strains without modifying the internal structure),

followed by the bionogel with concentration of 1% cellulose, and, finally, the bionogels with 1.5 and 2% cellulose.

At 7 days postgelation, the γ_c values of the bionogels with 1, 1.5, and 2% cellulose were similar: 0.022, 0.018, and 0.019%, respectively. The exception was the bionogel with 0.5% cellulose, whose γ_c was not reached within the strain range used in the test, which was similar to the case observed at 3 days postgelation; therefore, this bionogel presented an LVR for all strains used in the test. Consequently, the bionogel with 0.5% cellulose did not present a clear yielding behavior within the studied range [20], since its structure had a weak network, and therefore, it exhibited the most capacity for deformation in comparison with the other samples, which were more solid-like. These different results obtained at 3 and 7 days postgelation indicated that for 3 days, the rheological properties of the bionogels were evolving, i.e., the gel networks were not fully constituted.

In general, the obtained γ_c values were lower than those found for natural biopolymer gels and conventional ionogels containing natural biopolymers, which present γ_c values of ~1% and 1.1–1.8%, respectively [21,22]. Thus, in the present work, the formulated bionogels had less capacity for deformation than do these types of gels.

3.3. Rheological spectra

The rheological spectra showed that the elastic modulus (G') was higher than the loss modulus (G''), and G' was almost constant in all cases (Fig. 5). Therefore, the formulated bionogels at 3 and 7 days postgelation exhibited dominant elastic behavior. For this reason, the studied region of frequencies in the bionogels spectra belonged to the plateau region [23], i.e., the internal structure of the bionogels is gel-type because there were interactions between cellulose and Chlys.

At 3 days postgelation, there was a strong influence of the cellulose content. The bionogel with 2% cellulose (Fig. 5a) exhibited the highest values of G' , e.g., at 4 Hz, the G' values were 1.5, 2.8, 7.7, and 30 kPa

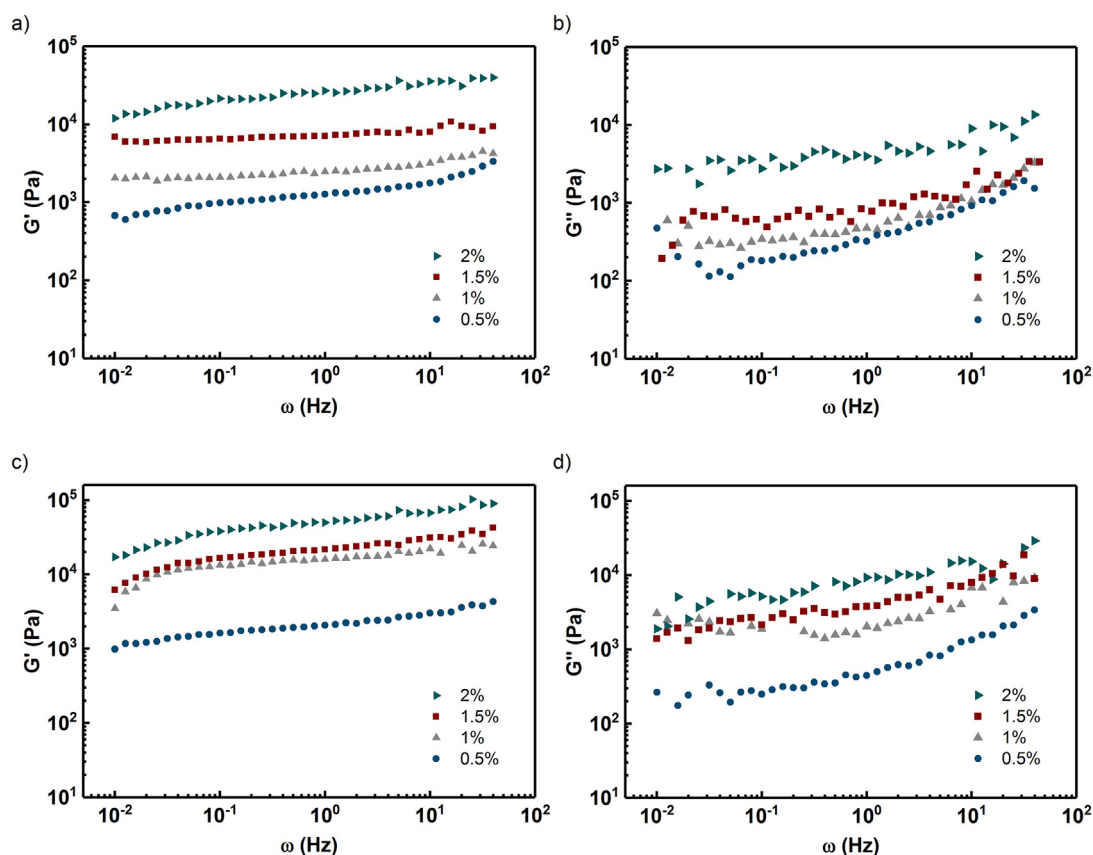


Fig. 5. Rheological spectra of the formulated bionogels at 3 days (a and b) and 7 days postgelation (c and d).

Table 1

Values of parameters of the model $G' \sim \omega^a$, the ratios of G'/G'' at 4 Hz and 45 Hz, for the cellulosic bionogels at 3 and 7 days of post-gelation.

	Cellulose concentration (%)	a	G_0 (Pa)	R^2	G'/G'' (4 Hz)	G'/G'' (45 Hz)
3 days	2	0.129 ± 0.003	25491 ± 1	0.961	6.5	3.2
	1.5	0.060 ± 0.003	7450 ± 1	0.864	6.2	2.6
	1	0.091 ± 0.004	2649 ± 1	0.863	4.0	1.8
	0.5	0.157 ± 0.004	1336 ± 1	0.950	2.6	1.7
7 days	2	0.167 ± 0.005	49805 ± 1	0.938	5.6	3.1
	1.5	0.171 ± 0.005	21526 ± 1	0.934	4.1	2.5
	1	0.144 ± 0.008	15536 ± 1	0.802	5.5	3.4
	0.5	0.142 ± 0.003	2190 ± 1	0.966	2.9	1.2

for the bionogels with 0.5, 1, 1.5, and 2% cellulose, respectively. In this respect, the bionogel with 2% cellulose presented the most solid-like behavior. Regarding G'' , the trend of the results was the same (Fig. 5b). For example, at 4 Hz frequency, the values of G'' were 0.6, 0.7, 1.2 and 4.6 kPa for the bionogels with 0.5, 1, 1.5 and 2% cellulose, respectively; therefore, the bionogel with 2% cellulose had the most viscous behavior. For all samples, the values of G' were greater than those of G'' . Note that this influence was greater when the cellulose load was lower.

At 7 days postgelation, the values of G' for the samples containing 0.5, 1, 1.5, and 2% cellulose at 4 Hz were 2, 18, 26, and 61 kPa, respectively. The G' values presented the same behavior as that exhibited at 3 days postgelation (Fig. 5c), i.e., as the cellulose load was increased, the G' increased, with exception of the sample with 1% cellulose, whose behavior was similar to that of the bionogel with 1.5% cellulose. In the case of G'' , the same tendency detected for G' was observed (Fig. 5d), in that the bionogel with 2% cellulose exhibited higher values of G'' , e.g., at 4 Hz, the values were 0.8, 3.2, 6.3, and 11 kPa for the bionogels with 0.5, 1, 1.5, and 2% cellulose, respectively. As observed at 3 days postgelation, the values of G' were greater than those of G'' .

The postgelation time had an influence on the studied rheological properties. Thus, at 7 days postgelation, all moduli increased compared to the values at 3 days postgelation. For instance, for the bionogel with a 2% cellulose load, at 3 days, the values of G' (4 Hz) and G'' (4 Hz) were 51 and 58% lower, respectively, than those at 7 days. This could have been due to the interactions between ChLys and cellulose having increased because of the longer interaction time, i.e., at 3 days, the networks were not fully constituted (as mentioned in Section 3.2).

The formulated bionogels showed rheological properties and spectra similar to those obtained by different authors for other gels, such as hydrogels, for use in the medical/pharmaceutical sector. Slavutsky and Bertuzzi [24], Lee, Kim and Jeong [25], and Quah, Smith, Preston, Laughlin and Bhatia [26] developed hydrogels containing pectin and brea

gum, hyaluronic acid, and alginate, respectively, obtaining rheological spectra with shapes similar to those obtained in this work. In addition, the moduli acquired by Quah, Smith, Preston, Laughlin and Bhatia [26], who reported G' values between 0.2 and 10 kPa and G'' values from 0.02 to 1 kPa, were consistent with those obtained in this research (G' : 0.7–100 kPa, G'' : 0.1–20 kPa). Thus, these novel bionogels can potentially be used in this sector to obtain functional biomaterials.

3.4. Gel strength and classification of bionogels

A power-law model (Eq. (1)) was applied to the obtained elastic moduli (G') to model its response to the frequency, according to the polymer dynamics theory [27] as follows:

$$G' = G_0 \cdot \omega^a \quad (1)$$

where G_0 ($\text{Pa} \cdot \text{s}^a$) is the gel strength, the measurement of the elastic energy stored in a unit volume of the network, which is the intercept with the log G' -axis (Eq. (2)) [28], and a is the slope of the log G' -log frequency curve, which is particular to each material. The parameters of this modeling are shown in Table 1.

$$G_0 = \lim_{\omega \rightarrow 0} G'(\omega) \quad (2)$$

The interpretation of the parameter a from the point of view of the internal structure of the material is associated with the type of interactions inside the material. Thus, if a is zero, the material is formed by covalent interactions, a situation known as a “true gel”. Contrarily, if a is >0 , physical interactions are responsible for maintaining the gel-like structure [17,28]. On the studied days postgelation, the values of parameter a were higher than 0; therefore, the formulated bionogels were physical gels.

On the other hand, the gel strength, G_0 , varied as the cellulose load and postgelation time changed, as shown in Table 1. Thus, as the cellulose load in the bionogel was increased, the strength became greater, to such an extent that this parameter for the bionogel with 2% cellulose was 1808 and 2174% higher than that of the 0.5% cellulose bionogel at 3 and 7 days postgelation, respectively. These results suggested that as the cellulose load was increased, the interactions between cellulose and ChLys became higher. These interactions were physical due to the hydrogen bond formed between the amines and carboxylate of the ChLys with the hydroxyl group of the cellulose chain. Electrostatic interactions between the nitrogen of choline and the terminal oxygen of lysine could also occur, both with cellulose and with itself, which is in concordance with the findings of Scarpellini, Ortolani, Nucara, Baldassarre, Missori, Fastampa and Caminiti [16]. Water could also

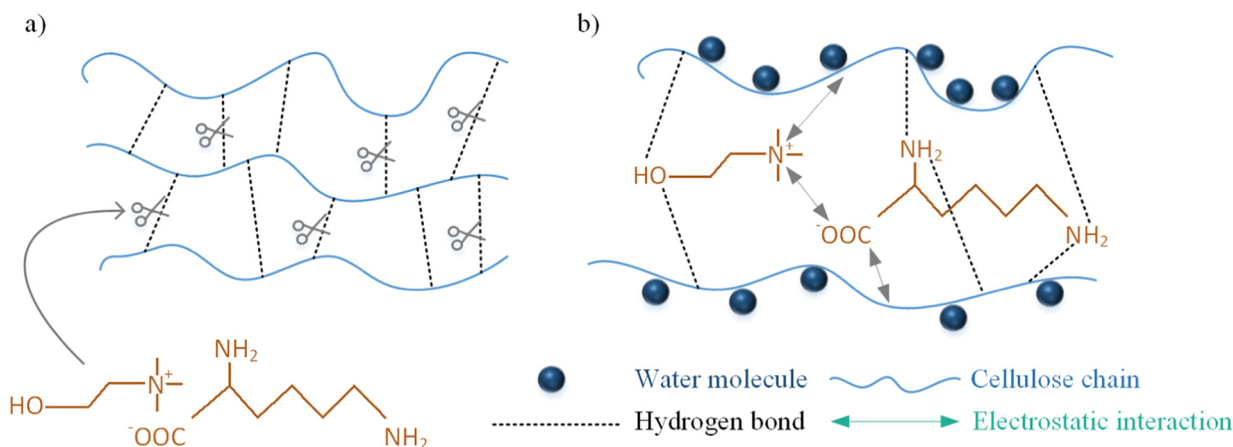


Fig. 6. Plausible mechanism of cellulosic bionogels formation with ChLys: (a) dissolution of cellulose and (b) interactions in the bionogel.

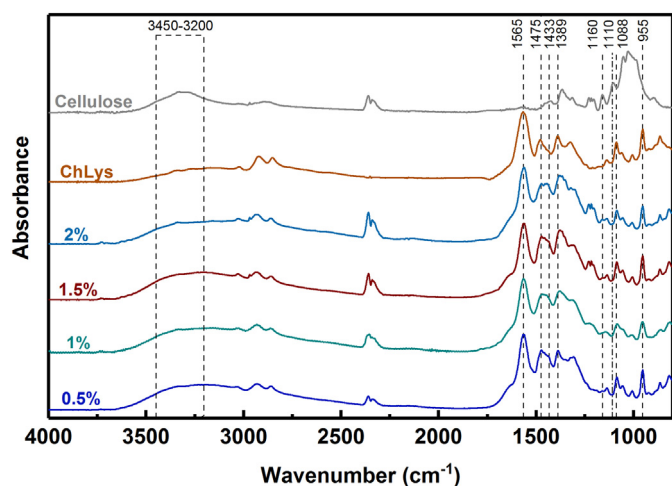


Fig. 7. FTIR/ATR spectra of the cellulose, ChLys and the formulated bionogels.

play a fundamental role in the gelation of bionogels due to their hygroscopic nature, helping in the formation of physical crosslinking points [13]. The proposed plausible mechanism of cellulosic bionogels formation is shown in Fig. 6. The influence of the postgelation time on G_0 was the same as that on the elastic and loss moduli.

To ensure that the interaction forces in the bionogels were physical, FTIR/ATR tests were performed. The spectra of the cellulose and ChLys exhibited the characteristic bands of these compounds (Fig. 7). The cellulose spectrum showed bands between 3400 and 3200 cm^{-1} corresponding to O—H stretching vibrations. The band at 1433 cm^{-1} is associated with the intermolecular hydrogen attraction at C6 of the aromatic ring group. The bands at 1160 and 1110 cm^{-1} are due to C—O—C stretching and ring asymmetry stretching, respectively [29,30]. On the other hand, ChLys spectrum exhibited a broad band between 3450 and 3100 cm^{-1} associated with O—H and N—H

stretchings. The band at 1565 cm^{-1} corresponds to asymmetric stretching of C=O. The 1475 cm^{-1} band is associated with C—H stretching vibration of CH_3 . In addition, the band at 1389 cm^{-1} is observed due to the CO_2 symmetric stretching. At 1091 cm^{-1} the band corresponding to the CH_n rocking/twisting is detected. Finally, the band at 955 cm^{-1} is related to C—N stretching [31]. The interaction between the cellulose and ChLys was physical because the spectra of the formulated bionogels showed overlapped bands corresponding to the cellulose and ChLys bands. In addition, there were no new bands indicating the formation of chemical bonds. Note that as the cellulose load was increased the characteristic bands of cellulose in the bionogels spectra were intensified.

To verify the physical interactions in the bionogels, they were washed with water (a more polar solvent than ChLys). In Fig. 8a, it can be observed that immediately after putting the bionogels in water, the ChLys free of interactions with cellulose was removed from the bionogel, and therefore, as the cellulose load increased, the opacity of the bionogel increased. Water replaced ChLys in its position through the creation of new hydrogen bonds, forming hydrogels. This effect can be observed in Fig. 8b. The same behavior was found for cellulosic bionogels formulated with conventional ionic liquids [18,22].

Regarding the classification of these novel bionogels, the relation G'/G'' was evaluated. Table 1 contains the G'/G'' ratios at 4 Hz as an example of this relation at a certain frequency for assessment. Additionally, the G'/G'' ratio at 45 Hz has also been included, with the objective of evaluating the behavior at high frequencies of the spectrum. According to the G'/G'' ratios at 4 Hz, the bionogels can be classified as weak physical gels because these ratios ranged between 2.6 and 6.5 (>10 corresponds to strong gels, and <10 is related to weak gels [32,33]). This type of gel is similar to that found by others authors examining different biopolymer-based ionogels, containing compounds such as agarose or guar gum [34,35]. Although the concept of a weak gel is applied for all formulated bionogels and for both studied postgelation times, as the percentage of cellulose varied, there were different levels of “weakness”. Thus, the bionogel with 2% cellulose presented as a well-

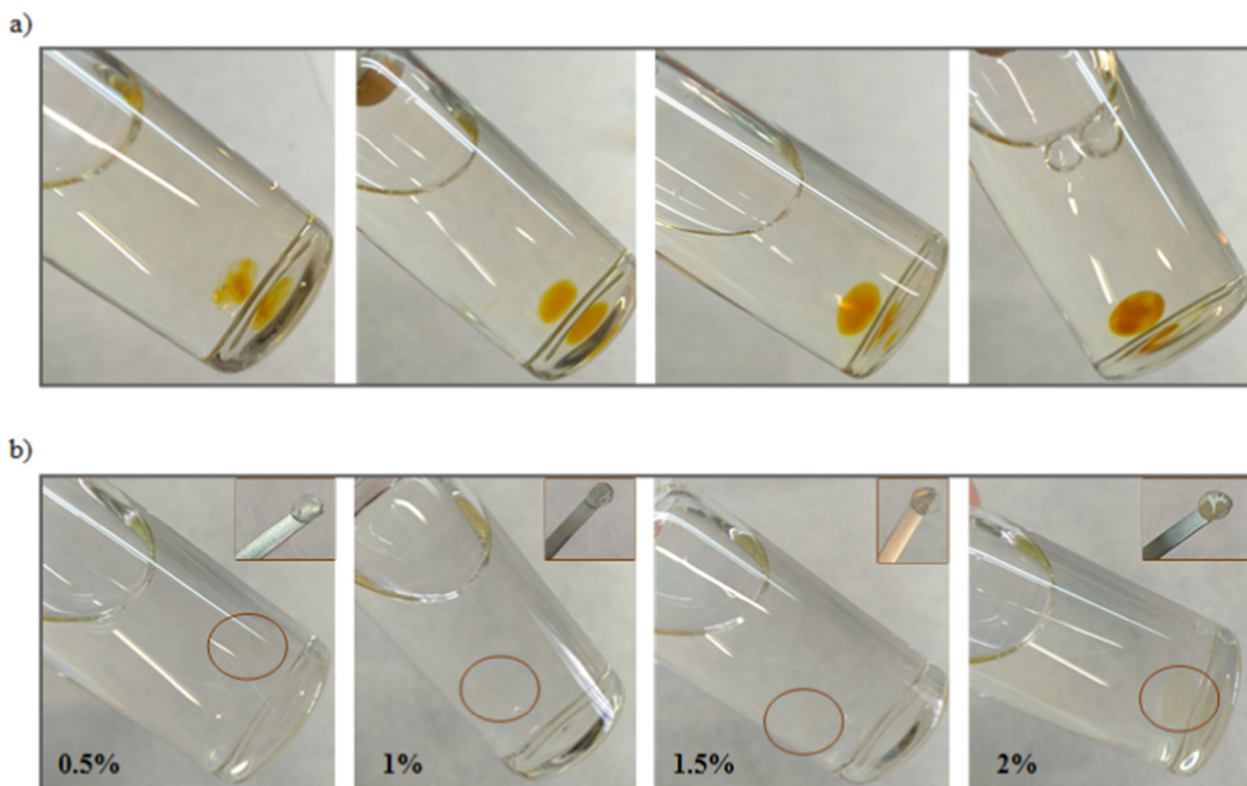


Fig. 8. Images of the bionogels submerged in water (a) and the formed hydrogels (b).

structured gel, with G'/G'' (4 Hz) ≈ 7 at 3 days and G'/G'' (4 Hz) ≈ 6 at 7 days, whereas the bionogel with 0.5% cellulose had G'/G'' values of approximately 2.5 and 2 times less than that of the 2% cellulose bionogel at 3 and 7 days postgelation, respectively. Therefore, the bionogel with 0.5% cellulose was the weakest bionogel at the studied postgelation times. These results are corroborated by the values of the G'/G'' ratio obtained near the end of the test (45 Hz) because the vicinity of the G' and G'' of this bionogel was higher than that of other bionogels at this frequency. This means that this bionogel is close to the leathery region at high frequencies [23].

Cholinium-based chemical cellulosic ionogels have been found in the literature, with moduli approximately 1000 and 200 Pa for elastic and loss moduli, respectively [4,36]. These values are lower than those obtained in this work for physical cellulosic bionogels. Thus, ChLys-based bionogels showed greater rheological properties than do chemical cholinium-based ionogels.

3.5. Complex viscosities of the bionogels

The results of the complex viscosities (η^*) for the range of studied frequencies are shown in Fig. 9.

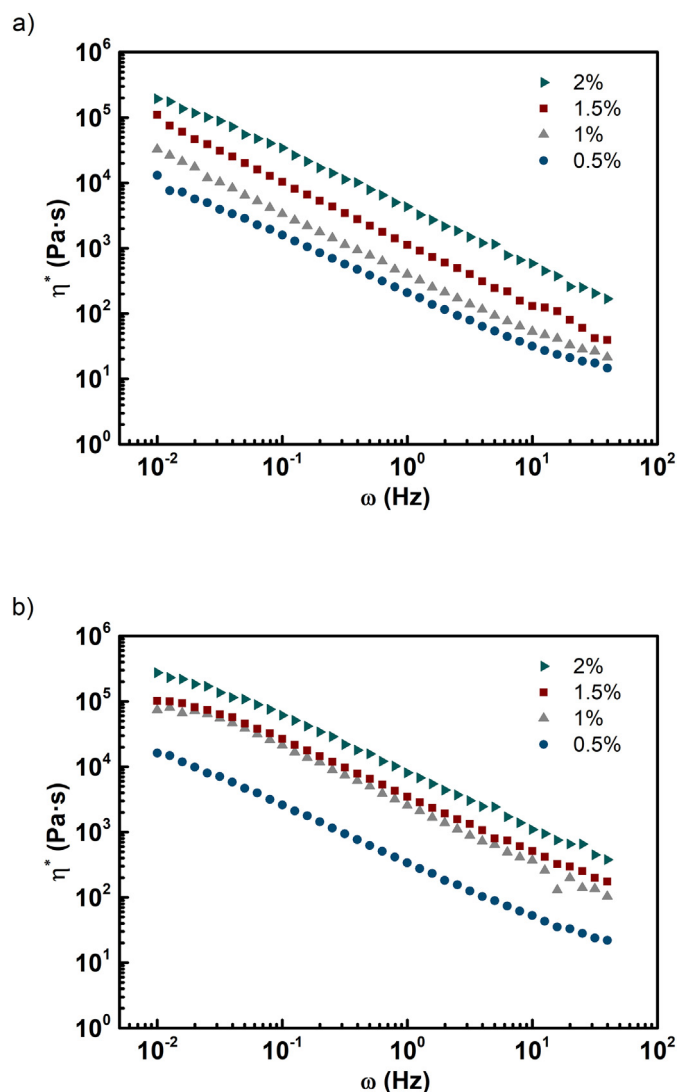


Fig. 9. Complex viscosity (η^*) of the cellulosic bionogels at 3 (a) and 7 (b) days postgelation.

Table 2
Parameters of the power-law model of the complex viscosity of the bionogels.

	Cellulose concentration (%)	q (Pa·s ^p)	p	R ²
3 days	2	8058 ± 1	0.170 ± 0.005	0.997
	1.5	3516 ± 1	0.177 ± 0.006	0.997
	1	2507 ± 1	0.138 ± 0.008	0.994
	0.5	369 ± 1	0.160 ± 0.004	0.998
7 days	2	4137 ± 1	0.131 ± 0.003	0.999
	1.5	1202 ± 1	0.060 ± 0.003	0.999
	1	440 ± 1	0.105 ± 0.005	0.997
	0.5	226 ± 1	0.173 ± 0.005	0.997

All cellulosic bionogels studied on different days postgelation presented a pseudoplastic-like behavior because the viscosity decreased when the frequency was increased [22]. The complex viscosities were fitted to a power-law model, as follows:

$$\eta^* = q \cdot \omega^{p-1} \quad (3)$$

where q (Pa·s^p) provides the resistance to deformation at frequencies near zero, and p is a measure of the behavior of the material relative to the frequency.

The parameters of the model of complex viscosities using the power-law (Eq. (3)) are shown in Table 2. The results of the parameter p confirmed this pseudoplastic behavior ($p < 1$) for all formulated bionogels.

The complex viscosity of the materials exhibited a strong dependence on the cellulose load. The parameter q values, which are a measure of the consistency of the material, increased as the cellulose load in the bionogel became greater. For instance, the bionogels with 1.5, 1 and 0.5% cellulose showed q values of 3, 2, and 21-fold at 3 days and of 3, 9 and 18-fold at 7 days postgelation, respectively, those of the bionogel with 2% cellulose. These data are consistent with the η^* values obtained in a previous work for cellulosic physical ionogels (q : 462–2500 Pa·s^p, η^* : 0.01–300 kPa) [22].

The obtained results confirm that a higher cellulose load provides more consistency because more hydrogen bonds are formed. The effects of the postgelation time on the studied parameters were the same as those found in the studied spectra.

4. Conclusions

Novel cellulosic bionogels were developed successfully using ChLys along with cellulose loads of 0.5, 1, 1.5, and 2 wt%. The obtained rheological properties of these bionogels revealed a strong dependence on the cellulose load, with the bionogel containing 2% cellulose being the most consistent and strongest and exhibiting the most solid-like behavior among the formulated bionogels. The interactions between ChLys and cellulose were physical and became more effective as the cellulose load in the bionogel was increased. The formulated bionogels were classified as weak physical gels due to the relation of their moduli. Due to the biocompatible and biodegradable characteristics of their compounds, these bionogels have great prospect for use in the medical/pharmacological sector.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support of the “Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades” under the funded project CTQ2017-88623-R and Victoria Rigual thanks the contract BES-2014-067788. Authors thank the support of the “Comunidad Autónoma de Madrid” under the funded project P2018/EMT-4348 (SUSTEC-CM). In addition, the authors are thankful for the collaboration by Cynthia Hopson in the development of this research.

References

- [1] K.S. Egorova, E.G. Gordeev, V.P. Ananikov, Biological activity of ionic liquids and their application in pharmaceuticals and medicine, *Chem. Rev.* 117 (10) (2017) 7132–7189.
- [2] D.-J. Tao, Z. Cheng, F.-F. Chen, Z.-M. Li, N. Hu, X.-S. Chen, Synthesis and thermophysical properties of biocompatible cholinium-based amino acid ionic liquids, *J. Chem. Eng. Data* 58 (6) (2013) 1542–1548.
- [3] L. Contrani, Choline-amino acid ionic liquids: past and recent achievements about the structure and properties of these really “green” chemicals, *Biophys. Rev.* 10 (2018) 873–880.
- [4] M. Isik, R. Gracia, L.C. Kollnus, L.C. Tomé, I.M. Marrucho, D. Mecerreyes, Cholinium-based poly (ionic liquid) s: synthesis, characterization, and application as biocompatible ion gels and cellulose coatings, *ACS Macro Lett.* 2 (11) (2013) 975–979.
- [5] X.-D. Hou, Q.-P. Liu, T.J. Smith, N. Li, M.-H. Zong, Evaluation of toxicity and biodegradability of cholinium amino acids ionic liquids, *PLoS One* 8 (3) (2013).
- [6] E. Liu, M. Li, L. Das, Y. Pu, T. Frazier, B. Zhao, M. Crocker, A.J. Ragauskas, J. Shi, Understanding lignin fractionation and characterization from engineered switchgrass treated by an aqueous ionic liquid, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6 (5) (2018) 6612–6623.
- [7] A. Tarannum, J.R. Rao, N.N. Fathima, Choline-based amino acid ILs–collagen interaction: enunciating its role in stabilization/destabilization phenomena, *J. Phys. Chem. B* 122 (3) (2018) 1145–1151.
- [8] J. Le Bideau, L. Viau, A. Vioux, Ionogels, ionic liquid based hybrid materials, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2) (2011) 907–925.
- [9] P.C. Marr, A.C. Marr, Ionic liquid gel materials: applications in green and sustainable chemistry, *Green Chem.* 18 (1) (2016) 105–128.
- [10] D. Hellio, M. Djabourov, Physically and chemically crosslinked gelatin gels, *Macromolecular Symposia*, Wiley Online Library 2006, pp. 23–27.
- [11] R.P. Swatloski, S.K. Spear, J.D. Holbrey, R.D. Rogers, Dissolution of cellulose with ionic liquids, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (18) (2002) 4974–4975.
- [12] J. Zhang, J. Wu, J. Yu, X. Zhang, J. He, J. Zhang, Application of ionic liquids for dissolving cellulose and fabricating cellulose-based materials: state of the art and future trends, *Mater. Chem. Front.* 1 (7) (2017) 1273–1290.
- [13] A. Takada, J.-i. Kadokawa, Fabrication and characterization of polysaccharide ion gels with ionic liquids and their further conversion into value-added sustainable materials, *Biomolecules* 5 (1) (2015) 244–262.
- [14] S. Zhu, Y. Wu, Q. Chen, Z. Yu, C. Wang, S. Jin, Y. Ding, G. Wu, Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review, *Green Chem.* 8 (4) (2006) 325–327.
- [15] H. Peng, S. Wang, H. Xu, G. Dai, Preparations, properties, and formation mechanism of novel cellulose hydrogel membrane based on ionic liquid, *J. Appl. Polym. Sci.* 135 (7) (2018), 45488.
- [16] E. Scarpellini, M. Ortolani, A. Nucara, L. Baldassarre, M. Missori, R. Fastampa, R. Caminiti, Stabilization of the tensile strength of aged cellulose paper by cholinium-amino acid ionic liquid treatment, *J. Phys. Chem. C* 120 (42) (2016) 24088–24097.
- [17] M. Irani, S.M. Razavi, E.-S.M. Abdel-Aal, P. Hucl, C.A. Patterson, Viscoelastic and textural properties of canary seed starch gels in comparison with wheat starch gel, *Int. J. Biol. Macromol.* 124 (2019) 270–281.
- [18] R.M. Kalinoski, J. Shi, Hydrogels derived from lignocellulosic compounds: evaluation of the compositional, structural, mechanical and antimicrobial properties, *Ind. Crop. Prod.* 128 (2019) 323–330.
- [19] H. Zhang, J. Wu, J. Zhang, J. He, 1-Allyl-3-methylimidazolium chloride room temperature ionic liquid: a new and powerful nonderivatizing solvent for cellulose, *Macromolecules* 38 (20) (2005) 8272–8277.
- [20] L. Mendoza, W. Batchelor, R.F. Tabor, G. Garnier, Gelation mechanism of cellulose nanofibre gels: a colloids and interfacial perspective, *J. Colloid Interface Sci.* 509 (2018) 39–46.
- [21] A.H. Clark, S.B. Ross-Murphy, Structural and mechanical properties of biopolymer gels, *Biopolymers*, Springer 1987, pp. 57–192.
- [22] M.M. Villar-Chavero, J.C. Domínguez, M.V. Alonso, M. Oliet, F. Rodríguez, Tuning the rheological properties of cellulosic ionogels reinforced with chitosan: the role of the deacetylation degree, *Carbohydr. Polym.* 207 (2019) 775–781.
- [23] H.A. Barnes, *A Handbook of Elementary Rheology*, University of Wales Aberystwyth, Wales, U. K., 2000.
- [24] A.M. Slavutsky, M.A. Bertuzzi, Formulation and characterization of hydrogel based on pectin and brea gum, *Int. J. Biol. Macromol.* 123 (2019) 784–791.
- [25] H.-Y. Lee, H.-E. Kim, S.-H. Jeong, One-pot synthesis of silane-modified hyaluronic acid hydrogels for effective antibacterial drug delivery via sol–gel stabilization, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 174 (2019) 308–315.
- [26] S.P. Quah, A.J. Smith, A.N. Preston, S.T. Laughlin, S.R. Bhatia, Large-area alginate/PEO-PPO-PEO hydrogels with thermoreversible rheology at physiological temperatures, *Polymer* 135 (2018) 171–177.
- [27] J.D. Ferry, *Viscoelastic Properties of Polymers*, John Wiley & Sons, 1980.
- [28] R. Ranjan, K. Rawat, H. Bohidar, Folic acid supramolecular ionogels, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19 (34) (2017) 22934–22945.
- [29] D. Trache, M.H. Hussin, C.T.H. Chuin, S. Sabar, M.R.N. Fazita, O.F.A. Taiwo, T.M. Hassan, M.K.M. Haafiz, Microcrystalline cellulose: isolation, characterization and bio-composites application—a review, *Int. J. Biol. Macromol.* 93 (Part A) (2016) 789–804.
- [30] V. Rigual, T.M. Santos, J.C. Domínguez, M.V. Alonso, M. Oliet, F. Rodríguez, Recovery and reuse of 1-Allyl-3-methylimidazolium chloride in the fractionation of *Pinus radiata* wood, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5 (3) (2017) 2384–2392.
- [31] M. Campetella, E. Bodo, R. Caminiti, A. Martino, F. D’Apuzzo, S. Lupi, L. Gontrani, Interaction and dynamics of ionic liquids based on choline and amino acid anions, *J. Chem. Phys.* 142 (23) (2015), 234502.
- [32] S. Ross-Murphy, K. Shatwell, Polysaccharide strong and weak gels, *Biorheology* 30 (3–4) (1993) 217–227.
- [33] A. Takegawa, M.-a. Murakami, Y. Kaneko, J.-i. Kadokawa, Preparation of chitin/cellulose composite gels and films with ionic liquids, *Carbohydr. Polym.* 79 (1) (2010) 85–90.
- [34] T.J. Trivedi, D. Srivastava, R.D. Rogers, A. Kumar, Agarose processing in protic and mixed protic–aprotic ionic liquids: dissolution, regeneration and high conductivity, high strength ionogels, *Green Chem.* 14 (10) (2012) 2831–2839.
- [35] L. Verger, S. Corre, R. Poirot, G. Quintard, E. Fleury, A. Charlot, Dual guar/ionic liquid gels and biohybrid material thereof: rheological investigation, *Carbohydr. Polym.* 102 (2014) 932–940.
- [36] M. Isik, R. Gracia, L.C. Kollnus, L.C. Tome, I.M. Marrucho, D. Mecerreyes, Cholinium lactate methacrylate: Ionic liquid monomer for cellulose composites and biocompatible ion gels, *Macromolecular Symposia*, Wiley Online Library 2014, pp. 21–24.

PUBLICACIÓN IV

“Chitosan-reinforced cellulosic bionogels: viscoelastic and antibacterial properties”

M. Mar Villar-Chavero, Juan C. Domínguez, M. Virginia Alonso,
Mercedes Oliet y Francisco Rodríguez

En revisión en *Carbohydrate Polymers*



27 hydrogen bonds with the reinforcement. The bionogel with 1 wt/wt. % chitosan loading
28 exhibited the highest viscoelastic properties (for 4 Hz, G' : 552 kPa, G'' : 99 kPa, and η^* :
29 22 kPa·s). Regarding the antibacterial properties, these gels showed a good inhibitory
30 capacity to *S. aureus* and *E. coli*, especially against the latter bacterium. For these reasons,
31 these novel ecofriendly gels are promising in the pharmaceutical/medical and biosensors
32 sectors to develop new functional materials.

33 **Keywords:** Ionogel, bionogel, cellulose, chitosan, rheology, ChLys.

34 **1. Introduction**

35 Biocomposites, materials composed of at least one material naturally derived, have been
36 presented up to now as an ecofriendly alternative to other composites harmful to the
37 environment (Rudin & Choi, 2012; Yıldızhan, Çalık, Özcanlı, & Serin, 2018). In this
38 respect, different biocomposites have been emerging, such as cellulosic ionogels
39 (Kadokawa, Murakami, & Kaneko, 2008; Peng, Wang, Xu, & Dai, 2018; Prasad et al.,
40 2018; Takada & Kadokawa, 2015). These materials are gel-like biocomposites composed
41 of an ionic liquid as liquid phase and cellulose as solid continuous phase (Marr & Marr,
42 2016). The use of cellulosic ionogels is focused on the electrochemical applications for
43 sensor or electronics devices (Shiflett & Scurto, 2017; Smith et al., 2017; Thiemann et al.,
44 2014). However, potential new applications of these materials in the
45 medical/pharmaceutical or biosensors sectors can be interesting due to the integration of the
46 properties of cellulose -biodegradable, biocompatible, ecofriendly and non-toxic- (Du et al.,
47 2019) and the ionic liquids (Chen, Xie, Li, & Chen, 2018; Marr & Marr, 2016). In this
48 sense, the biological properties of the ionic liquids, used to formulate the ionogel for the

49 medical/pharmaceutical sector, must be the same as those cellulose. Cholinium amino acid
50 ionic liquids (ChAAILs) are bionic liquids composed of cholinium cation and amino acid
51 anion (Gontrani, 2018). ChAAILs are perfect candidates for the formulation of ionogels for
52 the medical/pharmaceutical sector due to these components are biodegradable,
53 biocompatible, and non-toxic (Isik et al., 2013; Tarannum, Rao, & Fathima, 2018). The
54 ionogels formulated with ChAAILs and cellulose, i.e., completely biobased ionogels, can
55 be denoted as bionogels (M. M. Villar-Chavero et al., 2019).

56 The study of the viscoelastic properties of ionogels allows the determination of their
57 behavior under a certain strain, and provides information of its internal structure ,i.e., the
58 type of interactions between the components in the bionogel: physical or chemical (Irani,
59 Razavi, Abdel-Aal, Hucl, & Patterson, 2019). Physical bionogels can be classified as strong
60 or weak gels as a function of their rheological spectra. Both strong and weak gels exhibit
61 solid-like behavior at small strains, i.e., the same mechanical spectrum: elastic modulus
62 (G') > loss modulus (G''). However, the moduli of the strong gels are almost constant with
63 the frequency over a broad frequency range. Contrarily, weak gels present a behavior
64 intermediate between solid and viscous. Thus, for weak gels, the moduli are strongly
65 frequency dependent (Ferenc Horkay, 2018). Another criterion used for discerning this type
66 of physical gels is the relation between G'/G'' . In this case, if the relation $G'/G'' > 10$
67 corresponds to strong gels, and if $G'/G'' < 10$ the gels are weak (Takegawa, Murakami,
68 Kaneko, & Kadokawa, 2010).

69 Chitosan is a polysaccharide composed of *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) and D-
70 glucosamine (Glc) units, which is obtained by deacetylation of chitin, biopolymer from the
71 exoskeleton of arthropods or cell walls of fungi and yeast (Rinaudo, 2006). This involves

72 the valorization of great wastes since most of the chitin sources come from seafood
73 processing industries (Nunes et al., 2016; Villar-Chavero, Domínguez, Alonso, Oliet, &
74 Rodríguez, 2018). The unique biological properties of chitosan make it an suitable material
75 for use as biocomposite in medical/pharmaceutical industry, such as biocompatibility,
76 biodegradability, non-toxic, antibacterial, antioxidant, antitumor, hemostatic, etc. (Dash,
77 Chiellini, Ottenbrite, & Chiellini, 2011). The physical-chemical properties that define
78 chitosan are the degree of deacetylation (DD) and the molecular weight (Villar-Chavero,
79 Domínguez, Alonso, Oliet, & Rodríguez, 2019). The DD is the percentage of Glc units
80 presents in the polymeric chain. If $DD > 50\%$, the polymer is called chitosan (Chang, Tsai,
81 Lee, & Fu, 1997). In the present work, chitosan is employed in the formulation of
82 reinforced bionogels to improve the biological and viscoelastic properties.

83 The aim of this work is to develop new materials gel-type called bionogels completely
84 biobased and ecofriendly with cholinium lysinate (ChLys) and cellulose as the matrix,
85 reinforced with different loadings of chitosan. The unique combination of the ChLys,
86 cellulose and chitosan can provide to the new material with strong mechanical and
87 antimicrobial properties that will be studied in this paper. Moreover, because these
88 materials have a potential projection in the medical/pharmaceutical and biosensor sectors,
89 the capability antibacterial was evaluated, using *Escherichia coli* and *Staphylococcus*
90 *aureus*.

91

92

93

94 **2. Experimental section**

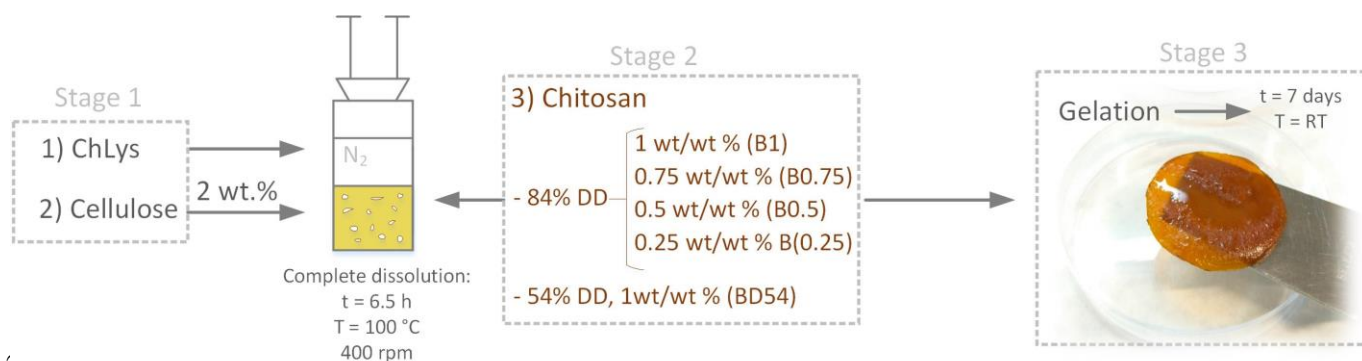
95 **2.1. Materials**

96 ChLys with purity > 90% was acquired from Iolitec GmbH, whose chemical structure is
97 shown in Fig. S1. Microcrystalline cellulose Avicel® PH-101 (degree of polymerization of
98 230) was acquired from Sigma-Aldrich. Chitosan with DD of 54 and 84% were obtained by
99 deacetylation process of the chitin from *Chionoecetes opilio* and the DD of the obtained
100 chitosan was determined by FTIR analysis, according to a previous work (Villar-Chavero et
101 al., 2018). All materials were dried in a vacuum oven before use for 12 h at 40 °C.

102 **2.2. Formulation of chitosan-reinforced cellulosic bionogels**

103 The formulation process of the chitosan-reinforced bionogels was performed in three
104 stages (Fig. 1). The first stage was the formulation of the matrix (5 g). For this stage,
105 microcrystalline cellulose was added in 2 dosages of 1 wt. % to the ChLys, up to 2 wt. %,
106 at 100 °C under magnetic stirring of 400 rpm and N₂ atmosphere for 6.5 h (M. M. Villar-
107 Chavero et al., 2019). Once the complete dissolution of the cellulose was reached, chitosan
108 with DD of 84% was added to the mixture with different loadings (0.25, 0.5, 0.75, and 1
109 wt/wt %). A sample with a load of 1 wt/wt % chitosan with DD of 54% was formulated to
110 corroborate the influence of the DD on the studied properties of these chitosan-reinforced
111 bionogels. In all cases, the addition of chitosan was conducted at 100 °C and 400 rpm. The
112 justification for the maximum chitosan load being 1 wt/wt % was because higher amounts
113 of chitosan made the mixture highly viscous and could not be worked with.

114 The last stage was the gelation process. The mixtures of ChLys/cellulose/chitosan were
 115 poured in a steel plate covered with PET film to avoid the chitosan-reinforced bionogels
 116 sticking to the plate with a thickness of 2 mm. The samples were left to stand at room
 117 temperature (RT) for 7 days to complete the gelation.¹⁶ The obtained chitosan-reinforced
 118 bionogels were denoted according to the load of the chitosan and the DD; thus the chitosan-
 119 reinforced bionogels with 0.25, 0.5, 0.75 and 1 wt/wt % chitosan with DD of 84% were
 120 called B0.25, B0.5, B0.75, and B1, respectively, and the bionogel with 1 wt/wt % chitosan
 121 with DD of 54% was named BD54.



1:

123 **Fig. 1.** Schematic of the formulation of bionogels reinforced with chitosan.

124 **2.3. Rheological tests**

125 Rheological tests were conducted in an ARES rheometer (TA Instruments) using serrated
 126 parallels plates of 25 mm of diameter and a gap of 2 mm to evaluate the viscoelastic
 127 properties of the formulated chitosan-reinforced bionogels. Time sweep tests were
 128 conducted at 1 Hz of frequency and $5 \cdot 10^{-3}\%$ of strain for 30 min to corroborate the stability
 129 during the measurement time. Strain sweep tests were performed at 50 Hz (maximum
 130 frequency of the frequency sweep tests) and from $3 \cdot 10^{-4}$ to 0.5% of strain to obtain the
 131 linear viscoelastic region (LVR). Dynamic sweep tests were carried out at strain of $5 \cdot 10^{-3}\%$

132 (within LVR), with frequency ranging between 0.01 and 50 Hz, to obtain the rheological
133 spectra. All measures were conducted under isothermal conditions at 25 °C, and the
134 generated torque was > 0.02 g·cm (minimum torque value of the instrument).

135 **2.4. Antibacterial activity**

136 The microbial inhibition activity was tested through a modified agar diffusion method
137 (Fig. S2). For this purpose, two bacteria were used: *E. coli* (Gram-negative bacterium,
138 ATCC 25922) and *S. aureus* (Gram-positive bacterium, ATCC 25923), acquired from
139 Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Bacteria were cultivated on the medium 1 of
140 CECT for 24 h at 37 °C. Then, colonies of these bacteria were suspended in a test tube
141 containing Ringer saline solution and the optical density, measured with an optical
142 spectrophotometer, was adjusted to 0.5 at $\lambda=600$ nm (10^6 - 10^7 CFU/mL of bacteria). An
143 inoculum of 0.1 mL was seeded in nutrient agar plates with a sterilized cotton swab.
144 Sterilized disks of cellulose of 13 mm (D_0) were placed in these agar plates, and chitosan-
145 reinforced cellulosic bionogels, previously cut with a diameter of 5 mm, were put centered
146 and over these cellulose disks. The agar dishes with the chitosan-reinforced bionogels were
147 incubated for 24 h at 37 °C, and the inhibition zone around the disk was measured. The
148 cellulose disk was essential due to the partially melted/diffusion of the bionogels; thus, the
149 inhibition zone was better controlled.

150 Control tests were run employing of bionogel with 2% cellulose without chitosan. Thus,
151 the bionogels without chitosan were placed onto seeded agar plates over the cellulose disks
152 and incubated in the same conditions that chitosan-reinforced bionogels. All tests were
153 performed in triplicate.

154 **3. Results and discussion**

155 *3.1. Dynamic time and strain sweep test*

156 Time sweep tests were conducted to evaluate the stability of the chitosan-reinforced
157 bionogels during the experiments. In addition, strain sweep tests were carried out to obtain
158 the linear viscoelastic region (LVR). The results of the time sweep test showed that, for
159 each sample, both complex modulus (G^*) and complex viscosity (η^*) did not vary
160 significantly (Fig. S3). Then, the chitosan-reinforced bionogels were stable with the time.

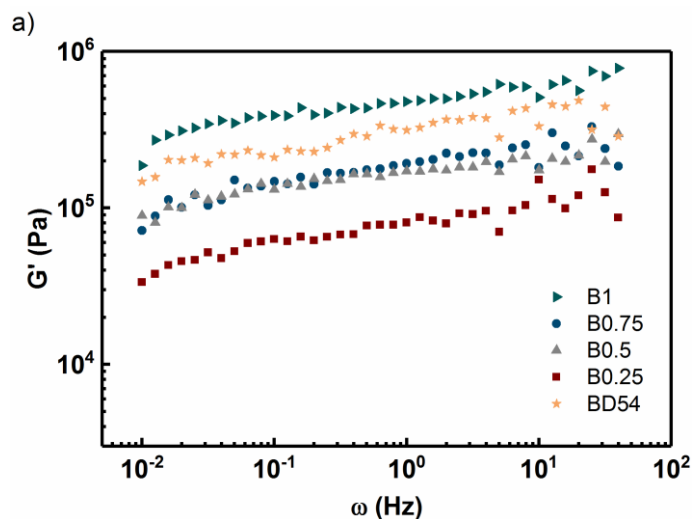
161 The obtained spectra of the chitosan-reinforced bionogels through strain sweep tests are
162 shown in the supplementary information (Fig. S4). The limits of the LVRs (γ_c) were
163 $11 \cdot 10^{-3}$, $17 \cdot 10^{-3}$, $7.7 \cdot 10^{-3}$, $5.4 \cdot 10^{-3}\%$ for B0.25, B0.5, B0.75, and B1, respectively. Thus, the
164 chitosan-reinforced bionogels with higher γ_c values, B0.25, and B0.5, showed greater
165 deformation capabilities without distorting their internal structures than the other samples.
166 The sample B1 presented the lowest γ_c value; therefore, its internal structure was more
167 cohesive. The interface matrix-reinforcement of the bionogel B1 was stronger than that of
168 remaining chitosan-reinforced bionogels; as a result, this bionogel was more fragile (Hull &
169 Clyne, 1996).

170 The γ_c value of the BD54 bionogel was $5.0 \cdot 10^{-3}\%$ similar to B1. This indicated that the
171 LVR did not change significantly with the DD of the reinforcement. This trend was
172 contrary to the behavior of other cellulosic non biobased ionogels reinforced with chitosan,
173 in which the difference of γ_c was 0.7% between chitosan with DD of 54 and 84%, with a 3
174 wt/wt % chitosan loading, (M Mar Villar-Chavero et al., 2019). This difference was due to
175 the chitosan loading used in this work, < 3 wt/wt %.

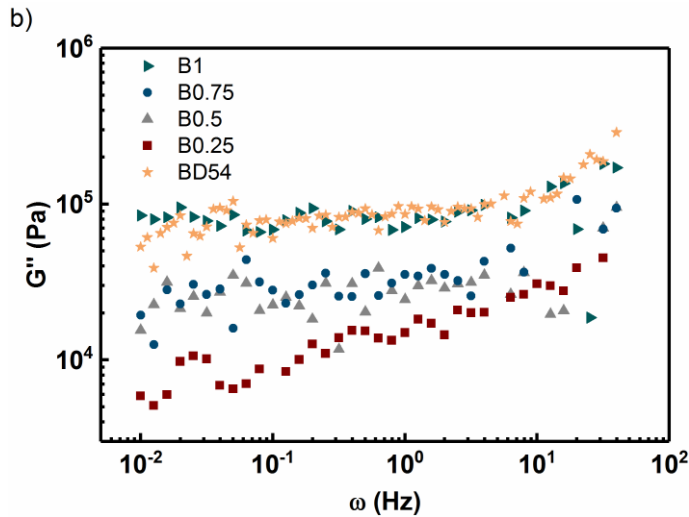
176 The LVR of the bionogel without reinforcement, i.e., the matrix ChLys with 2%
177 cellulose, according to a previous work was of $19 \cdot 10^{-3} \%$ (M. M. Villar-Chavero et al.,
178 2019), higher value in comparison with the studied reinforced bionogels. Therefore, by
179 introducing a chitosan reinforcement, the LVR decreased, and the bionogel became more
180 fragile than the matrix but more rigid (more solid-like behavior). This is due to the stronger
181 interface between matrix-reinforcement of the reinforced cellulosic bionogels.

182 3.2. Rheological spectra

183 The rheological spectra of the viscoelastic formulated chitosan-reinforced bionogels for
184 the range of studied frequencies are shown in Fig. 2. In all cases, the elastic moduli (G')
185 presented higher values than the loss moduli (G''); hence, the elastic behavior was dominant
186 in the obtained spectra. In this respect, the rheological spectra belonged to the plateau
187 region ($G' > G''$), spectra typical of gel materials. (Barnes, 2000; Ross - Murphy, 1998)



188



190 **Fig. 2.** Rheological spectra of the reinforced bionogels. (a) Elastic modulus (G') and (b)
 191 loss modulus (G'').

192 The rheological spectra showed a strong influence of the reinforcement load on the
 193 rheological properties. An increment of the G' was observed by increasing the chitosan
 194 loading, except the samples B0.75 and B0.5, whose behaviors were practically the same
 195 (Fig 2a). The obtained G' values, e.g., at 4 Hz, were 95.6, 197, 223, and 552 kPa for
 196 chitosan-reinforced bionogels B0.25, B0.5, B0.75, and B1, respectively. The bionogel B1
 197 exhibited the higher values of G' ; therefore, this bionogel had the most solid-like behavior.

198 Regarding chitosan loading, the G'' showed the same tendency as G' (Fig. 2b). The values
 199 of G'' , at 4Hz as an example, were 2, 35, 43, and 99 kPa for B0.25, B0.5, B0.75, and B1,
 200 respectively. The bionogel B1 also exhibited the most viscous-like behavior.

201 The moduli of the chitosan-reinforced bionogels were significantly higher compared to
 202 the rheological spectrum of the matrix (M. M. Villar-Chavero et al., 2019). For example,
 203 the bionogel B1, at 4Hz, the G' and G'' values were almost 20 and 22 times higher than
 204 those of matrix. Therefore, the addition of chitosan caused an increase in the elastic and
 205 viscous behavior, i.e., an increment of the viscoelastic properties.

206 As for the DD of the chitosan, at 4 Hz, the G' value was 374 kPa for the BD54 sample,
207 1.5 times higher than that of B1. However, the G'' value was 99.7 kPa, which was
208 practically the same value than B1 sample. Therefore, the DD of the chitosan only affected
209 the elastic behavior of the chitosan-reinforced bionogels. Contrary to the present work, for
210 the cellulosic ionogels non biobased formulated with chloride 1-butyl-3-methylimidazolium
211 (M Mar Villar-Chavero et al., 2019), both G' and G'' varied as the DD increased, probably
212 due to the different matrix (greater interactions matrix-reinforcement, and thus, more solid
213 like behavior, as mentioned above).

214 One of the significant disadvantages presents in the use of hydrogels is the weak
215 mechanical properties of them (Hoffman, 2012). The formulated chitosan-reinforced
216 bionogels provide higher mechanical properties than hydrogels. For example, Li et al.
217 (2019) developed keratin-conjugated insulin hydrogels with G' values between 30 and 180
218 Pa, and G'' values ranged 10-100 Pa; Villanueva, Cuestas, Pérez, Dall, and Copello (2019)
219 formulated keratin hydrogels with ZnO nanoplates, whose G' values were between 90 to
220 100 kPa; and Y. Chen et al. (2018) developed composite hydrogel composed of chitosan,
221 poly(glutamic acid) and alginate with G': 3-10 kPa and G'':0.2-1 kPa.

222 ***3.3. Strength and classification of formulated chitosan-reinforced bionogels***

223 The strength of the chitosan-reinforced bionogels was evaluated according to the
224 polymer dynamics theory (Ferry, 1980). The obtained G' values were modelled using a
225 power-law model:

$$226 \quad G' = G_0 \cdot \omega^a \quad (1)$$

227 where G_0 is defined as the gel strength ($\text{Pa} \cdot \text{s}^a$) and “a” is a parameter of the equation. In
 228 physical terms, the G_0 is the measurement of the elastic energy stored in a unit of the gel
 229 network (Ranjan, Rawat, & Bohidar, 2017). Regarding the parameter “a”, this provides an
 230 idea of how the internal structure of the gel is connected; thus, if “a” >0 the gel is formed by
 231 physical interactions among their components, and if “a” ≈ 0 the internal interactions of the
 232 gel are chemical (Irani et al., 2019). To obtain the G_0 and “a”, a linearization of Eq. 1 for
 233 each reinforced bionogel was conducted, whose obtained parameters are shown in Table 1.

234 **Table 1.** “a” and G_0 values of the G' model with the frequency, and the ratios G'/ G'' at 4 Hz
 235 for the formulated chitosan-reinforced bionogels.

Bionogel	a \pm SD*	G_0 (Pa) \pm SD*	R ²	G'/ G'' (4 Hz)
B0.25	0.137 \pm 0.005	78674 \pm 1	0.907	4.7
B0.5	0.110 \pm 0.004	166886 \pm 1	0.918	5.5
B0.75	0.123 \pm 0.007	182860 \pm 1	0.828	5.2
B1	0.106 \pm 0.004	474089 \pm 1	0.918	5.6
BD54	0.126 \pm 0.006	311085 \pm 1	0.854	3.8

236

237 *: standard deviations of the parameters obtained by Eq. 1.

238 The values of the parameter “a” were greater than zero. For this reason, the interactions
 239 of the chitosan-reinforced bionogels were physical (M. M. Villar-Chavero et al., 2019). The
 240 G_0 values increased with the chitosan loading. For example, the G_0 of the sample B1 was
 241 503% higher than that of B0.25 bionogel. This could be due to the number of physical
 242 interactions that took place in the internal structure of the chitosan-reinforced bionogels.
 243 Thus, by increasing the reinforcement, more interactions were formed between matrix and
 244 chitosan, and, therefore, the bionogel was stronger. The results of the G_0 were higher in all
 245 cases than that of the matrix -58% for B0.25, and 852% for B1- (M. M. Villar-Chavero et
 246 al., 2019).

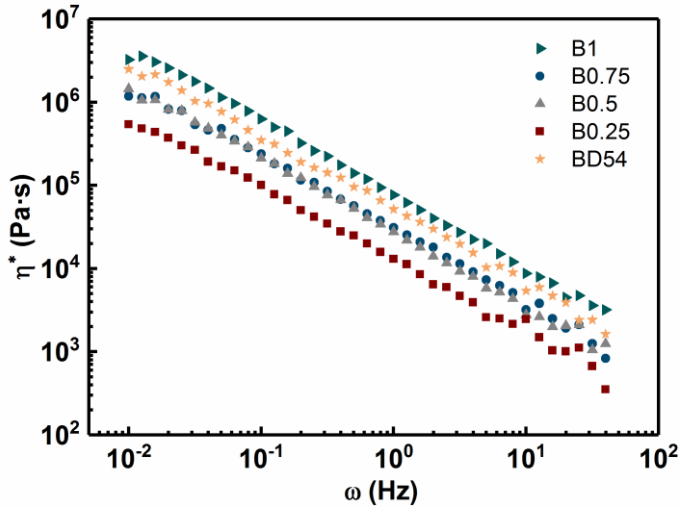
247 The difference between the gel strength of B1 and BD54 samples was due to the different
248 DD of the chitosan. As reported in previous work, a DD of 84% of the chitosan used as
249 reinforcement of bionogels provided greater gel strength than the DD of 54% because of
250 the formation of more hydrogen bonds (M Mar Villar-Chavero et al., 2019). This is
251 corroborated in this work, i.e., the same behavior was obtained with a different ionic liquid.

252 The formulated chitosan-reinforced bionogels exhibited slightly frequency dependent
253 spectra in the studied range. According to the first criterion (see introduction), the chitosan-
254 reinforced bionogels exhibited behavior intermediate between strong and weak gels, due to
255 the dependence of the moduli with the frequency and the shape of the spectra. Thus, it was
256 not possible to determine a specific type of gel for the formulated chitosan-reinforced
257 bionogels. According to the second criterion, based on the relation G'/G'' (Table 1), these
258 relations were less than 10 in all bionogels; thus, the chitosan-reinforced bionogels were
259 weak gels. To unify both criteria, the formulated chitosan-reinforced bionogels could be
260 classified as weak gels, but stronger than the pure weak gels.

261 ***3.4. Consistency of the reinforced chitosan-reinforced bionogels***

262 The complex viscosity (η^*) of the formulated chitosan-reinforced bionogels was
263 evaluated through the data obtained in the frequency sweep tests. The obtained results of η^*
264 are shown in Fig. 3. In all cases, the formulated chitosan-reinforced bionogels exhibited a
265 shear-thinning or pseudoplastic behavior due to the decrease of the η^* with increasing
266 frequency. The chitosan loading influenced the η^* values because as the reinforcement was
267 increased the η^* increased, except samples B0.5 and B0.75, which presented the same
268 behavior as in the case of the rheological spectra. For example, at 4Hz, the η^* values were

269 3908, 8011, 9107, and 22422 Pa·s for samples B0.25, B0.5, B0.75, and B1, respectively.
 270 Therefore, the sample B1 showed the highest resistance to deformation.



271

272 **Fig. 3.** Complex viscosity (η^*) obtained for reinforced bionogels.

273 A power-law model was applied to the obtained values of η^* to assess the consistency of
 274 the formulated chitosan-reinforced bionogels, as follows:

275
$$\eta^* = q \cdot \omega^{p-1} \tag{2}$$

276 where “q” (Pa·s^p) is the resistance to deformation at frequencies near zero, i.e., the
 277 consistency of the material and “p” is a parameter whose physical meaning is related to the
 278 behavior of the material. If “p”>1 the material presents a shear-thinning behavior, and on
 279 the contrary if “p”<1, the material shows a shear-thickening behavior.

280 The shear- thinning was corroborated due to the “p” values were less than the unit (Table
 281 2). On the other hand, the consistency of the chitosan-reinforced bionogels was raised by
 282 increasing the chitosan loading, since the “q” values were greater with the addition of
 283 chitosan (Table 2). Therefore, the bionogel B1 had the most consistency. Concerning DD of

284 the chitosan, the sample BD54 exhibited less consistency than the B1 sample. The reason of
285 this behavior could be due to the interactions of the chitosan with a DD of 54% with the
286 matrix were lower than those with chitosan with 84%, as discussed in the previous section.

287 **Table 2.** Parameters of the power-law model applied to complex viscosity for chitosan-
288 reinforced bionogels.

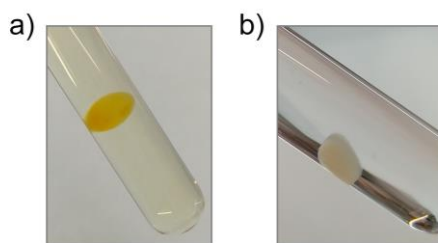
Bionogel	$q \text{ (Pa.s}^p) \pm \text{SD}^*$	$p \pm \text{SD}^*$	R^2
B0.25	12845 ± 1	0.141 ± 0.005	0.998
B0.5	27277 ± 1	0.114 ± 0.004	0.999
B0.75	30197 ± 1	0.130 ± 0.005	0.997
B1	77026 ± 1	0.103 ± 0.003	0.999
BD54	52169 ± 1	0.126 ± 0.005	0.998

289

290 *: standard deviations of the parameters obtained by Eq. 2.

291 **3.5. Proposed reinforced bionogel formation mechanism**

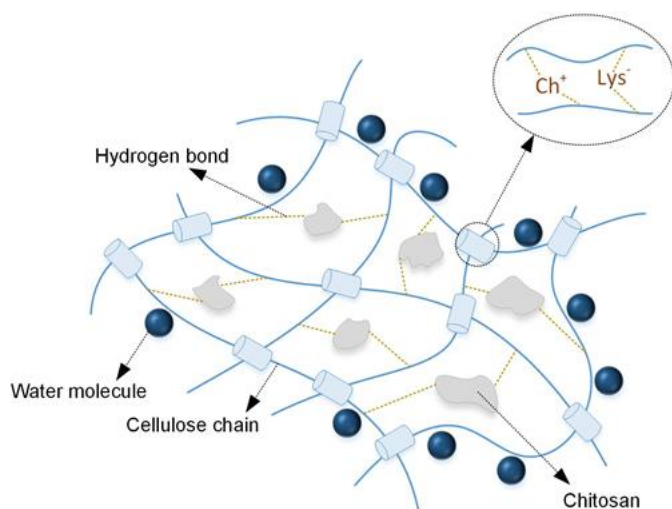
292 The chitosan-reinforced bionogels were soaked in water to remove ChLys to verify that
293 the interactions between the matrix and chitosan in the bionogel were physical. In this
294 sense, the water replaced the sites of ChLys, creating new hydrogen bonds (M. M. Villar-
295 Chavero et al., 2019). In Fig. 4a, the bionogel B0.25 soaked in water is shown as an
296 example, and in Fig. 4b, the hydrogel formed with this sample is displayed. Cellulose
297 chains and chitosan particles formed the structure of the hydrogel together with water.



298

299 **Fig. 4.** (a) Bionogel B0.25 soaked in water. (b) Hydrogel formed from the B0.25 sample.

300 With all obtained information about the interactions between the cellulose, ChLys, and
301 chitosan obtained from the rheology, a plausible mechanism of the reinforced bionogels
302 formation was proposed. This mechanism is shown in Fig. 5. The matrix, whose
303 interactions are hydrogen bonds, hosts the chitosan particles. These particles are linked by
304 hydrogen bonds with the cellulose of the matrix (more chitosan particles, more hydrogen
305 bonds). Note that the water molecules absorbed from ambient were essential to formation
306 the chitosan-reinforced bionogels due to the water helps to maintain the gel-like
307 structure.(Takada & Kadokawa, 2015)

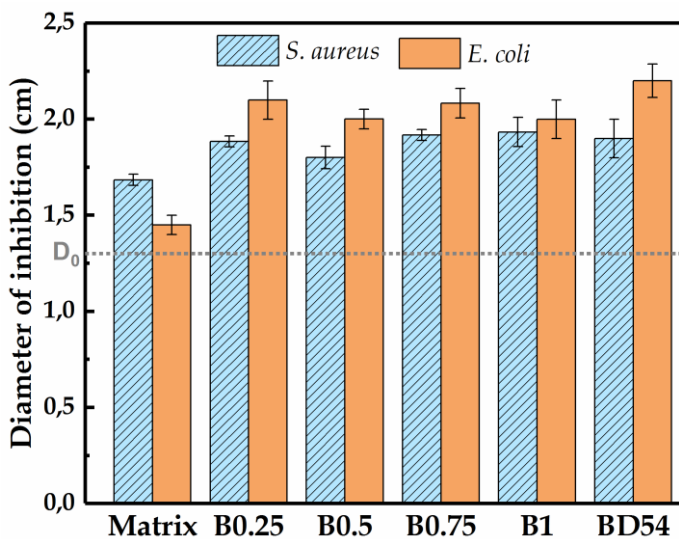


308
309 **Fig. 5.** Plausible mechanism of interaction in the reinforced bionogel.

310 **3.6. Antibacterial capability of reinforced chitosan-reinforced bionogels**

311 The results of the diameters of inhibition for the chitosan-reinforced bionogels and the
312 matrix to *S. aureus* and *E. coli* bacteria are shown in Fig. 6 (photographs of the
313 antimicrobial tests in Fig. S5). The diameters of inhibition did not exhibit significant
314 differences for both bacteria by increasing the chitosan loading, being the minimum
315 inhibition of 4 and 6 mm to *S. aureus* and *E. coli*, respectively. The inhibitory effect to *E.*

316 *coli* bacterium was higher than that of *S. aureus* in all cases, i.e., these formulated chitosan-
317 reinforced bionogels were more efficient on Gram-negative bacteria. The same behavior
318 was found by Fangbing, Wang, Zhu, and Zhang (2014) for chitosan reinforced cellulose
319 biocomposite sponges.



320

321 **Fig. 6.** Diameters of inhibition obtained of the antibacterial capability tests to *S. aureus* and
322 *E. coli* bacteria.

323 For sample BD54, the antibacterial capability was in line with the other reinforced
324 bionogels. However, its average diameter of inhibition to *E. coli* bacterium was almost 10%
325 higher than that of the B1 sample. This difference could be caused by the mechanism of
326 inhibition since the chitosan inhibition is attribute to its amino groups (Fangbing et al.,
327 2014; Fardioui, Kadmiri, el kacem Qaiss, & Bouhfid, 2018). Although the B1 sample had
328 more amino groups in its reinforcement than the BD54 sample, the availability of these
329 groups for inhibition was lower because they were forming more hydrogen bonds with
330 cellulose than sample BD54, as the rheology results revealed.

331 The formulated chitosan-reinforced bionogels presented more antibacterial character than
332 the matrix. For the *E. coli* bacterium, the bionogels B0.25, B0.5, B0.75, and B1 inhibited on
333 average 45, 38, 43, 38% more in comparison with the matrix, respectively. With regard to
334 *S. aureus*, the inhibition was slightly greater than the matrix but significantly lower than the
335 inhibition to *E. coli*. Therefore, the chitosan-reinforced cellulosic bionogels showed a
336 remarkable good antibacterial capability, which makes them potentially useful in the
337 medical/pharmaceutical sector.

338 **4. Conclusions**

339 Novel chitosan-reinforced cellulosic bionogels were developed with different chitosan
340 loadings. The rheological results, whose tests were within LVR, exhibited that the
341 viscoelastic properties (G' , G'' , G_0 and η^*) were higher by increasing the chitosan loading,
342 and therefore the interactions matrix-reinforced were greater with this increment. The
343 classification of the chitosan-reinforced cellulosic bionogels was weak gels, and the type of
344 interactions between matrix and reinforcement was physical (by hydrogen bonds). The
345 bionogel with the highest viscoelastic properties was the sample with 1% chitosan loading
346 and a DD of 84%.

347 The formulated chitosan-reinforced bionogels showed good antibacterial properties,
348 especially against *E. coli*. For all these reasons, the developed novel eco-friendly materials
349 can have a great projection in the medical/pharmaceutical and biosensors areas.

350

351

352

353 **Acknowledgments**

354 The authors are grateful for the financial support of “Ministerio de Ciencia, Innovación y
355 Universidades” under the funded project CTQ2017-88623-R and “Comunidad Autónoma
356 de Madrid” under the project P2018/EMT-4348 (SUSTEC-CM).

357 **References**

- 358 Barnes, H. A. (2000). *A handbook of elementary rheology*. Wales, U. K.: University of
359 Wales Aberystwyth.
- 360 Chang, K. L. B., Tsai, G., Lee, J., & Fu, W.-R. (1997). Heterogeneous N-deacetylation of
361 chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Research*, 303(3), 327-332.
- 362 Chen, J., Xie, F., Li, X., & Chen, L. (2018). Ionic liquids for the preparation of biopolymer
363 materials for drug/gene delivery: a review. *Green Chemistry*, 20(18), 4169-4200.
- 364 Chen, Y., Yan, X., Zhao, J., Feng, H., Li, P., Tong, Z., Yang, Z., Li, S., Yang, J., & Jin, S.
365 (2018). Preparation of the chitosan/poly (glutamic acid)/alginate polyelectrolyte
366 complexing hydrogel and study on its drug releasing property. *Carbohydrate*
367 *Polymers*, 191, 8-16.
- 368 Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile
369 semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*,
370 36(8), 981-1014.
- 371 Du, H., Liu, W., Zhang, M., Si, C., Zhang, X., & Li, B. (2019). Cellulose nanocrystals and
372 cellulose nanofibrils based hydrogels for biomedical applications. *Carbohydrate*
373 *Polymers*, 209, 130-144.
- 374 Fangbing, L., Wang, C., Zhu, P., & Zhang, C. (2014). Characterization of chitosan
375 microparticles reinforced cellulose biocomposite sponges regenerated from ionic
376 liquid. *Cellulose*, 21(6), 4405-4418.
- 377 Fardioui, M., Kadmiri, I. M., el kacem Qaiss, A., & Bouhfid, R. (2018). Bio-active
378 nanocomposite films based on nanocrystalline cellulose reinforced styrylquinoxalin-
379 grafted-chitosan: Antibacterial and mechanical properties. *International Journal of*
380 *Biological Macromolecules*, 114, 733-740.

381 Ferenc Horkay, J. F. D. (2018). *Polymer Gels: Basics, Challenges, and Perspectives*. A. S.
382 Series (Ed.), *Gels and Other Soft Amorphous Solids* (pp. 1–13): American Chemical
383 Society

384 Ferry, J. D. (1980). *Viscoelastic properties of polymers*: John Wiley & Sons.

385 Gontrani, L. (2018). Choline-amino acid ionic liquids: past and recent achievements about
386 the structure and properties of these really “green” chemicals. *Biophysical Reviews*,
387 10, 873-880.

388 Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery*
389 *Reviews*, 64, 18-23.

390 Hull, D., & Clyne, T. W. (1996). *An introduction to composite materials*: Cambridge
391 University Press.

392 Irani, M., Razavi, S. M., Abdel-Aal, E.-S. M., Hucl, P., & Patterson, C. A. (2019).
393 Viscoelastic and textural properties of canary seed starch gels in comparison with
394 wheat starch gel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 270-
395 281.

396 Isik, M., Gracia, R., Kollnus, L. C., Tomé, L. C., Marrucho, I. M., & Mecerreyes, D.
397 (2013). Cholinium-based poly (ionic liquid) s: synthesis, characterization, and
398 application as biocompatible ion gels and cellulose coatings. *ACS Macro Letters*,
399 2(11), 975-979.

400 Kadokawa, J.-i., Murakami, M.-a., & Kaneko, Y. (2008). A facile preparation of gel
401 materials from a solution of cellulose in ionic liquid. *Carbohydrate Research*,
402 343(4), 769-772.

403 Li, W., Gao, F., Kan, J., Deng, J., Wang, B., & Hao, S. (2019). Synthesis and fabrication of
404 a keratin-conjugated insulin hydrogel for the enhancement of wound healing.
405 *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 175, 436-444.

406 Marr, P. C., & Marr, A. C. (2016). Ionic liquid gel materials: applications in green and
407 sustainable chemistry. *Green Chemistry*, 18(1), 105-128.

408 Nunes, C., Maricato, É., Cunha, Â., Rocha, M. A. M., Santos, S., Ferreira, P., Silva, M. A.,
409 Rodrigues, A., Amado, O., & Coimbra, J. (2016). Chitosan–genipin film, a
410 sustainable methodology for wine preservation. *Green Chemistry*, 18(19), 5331-
411 5341.

412 Peng, H., Wang, S., Xu, H., & Dai, G. (2018). Preparations, properties, and formation
413 mechanism of novel cellulose hydrogel membrane based on ionic liquid. *Journal of*
414 *Applied Polymer Science*, 135(7), 45488.

415 Prasad, K., Mondal, D., Sharma, M., Freire, M. G., Mukesh, C., & Bhatt, J. (2018). Stimuli
416 responsive ion gels based on polysaccharides and other polymers prepared using
417 ionic liquids and deep eutectic solvents. *Carbohydrate Polymers*, 180, 328-336.

418 Ranjan, R., Rawat, K., & Bohidar, H. (2017). Folic acid supramolecular ionogels. *Physical*
419 *Chemistry Chemical Physics*, 19(34), 22934-22945.

420 Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer*
421 *Science*, 31(7), 603-632.

422 Ross - Murphy, S. B. (1998). Reversible and irreversible biopolymer gels—structure and
423 mechanical properties. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*,
424 102(11), 1534-1539.

425 Rudin, A., & Choi, P. (2012). *The elements of polymer science and engineering*: Academic
426 Press.

427 Shiflett, M. B., & Scurto, A. M. (2017). *Ionic Liquids: Current State and Future*
428 *Directions*: ACS Publications.

429 Smith, C. J., Wagle, D. V., O'Neill, H. M., Evans, B. R., Baker, S. N., & Baker, G. A.
430 (2017). Bacterial Cellulose Ionogels as Chemosensory Supports. *ACS Applied*
431 *Materials & Interfaces*, 9(43), 38042-38051.

432 Takada, A., & Kadokawa, J.-i. (2015). Fabrication and characterization of polysaccharide
433 ion gels with ionic liquids and their further conversion into value-added sustainable
434 materials. *Biomolecules*, 5(1), 244-262.

435 Takegawa, A., Murakami, M.-a., Kaneko, Y., & Kadokawa, J.-i. (2010). Preparation of
436 chitin/cellulose composite gels and films with ionic liquids. *Carbohydrate*
437 *Polymers*, 79(1), 85-90.

438 Tarannum, A., Rao, J. R., & Fathima, N. N. (2018). Choline-based amino acid ILs—collagen
439 interaction: enunciating its role in stabilization/destabilization phenomena. *The*
440 *Journal of Physical Chemistry B*, 122(3), 1145-1151.

441 Thiemann, S., Sachnov, S. J., Pettersson, F., Bollström, R., Österbacka, R., Wasserscheid,
442 P., & Zaumseil, J. (2014). Cellulose - based ionogels for paper electronics.
443 *Advanced Functional Materials*, 24(5), 625-634.

444 Villanueva, M. E., Cuestas, M. L., Pérez, C. J., Dall, V. C., & Copello, G. J. (2019). Smart
445 release of antimicrobial ZnO nanoplates from a pH-responsive keratin hydrogel.
446 *Journal of Colloid and Interface Science*, 536, 372-380.

447 Villar-Chavero, M. M., Domínguez, J. C., Alonso, M. V., Oliet, M., & Rodriguez, F.
448 (2018). Thermal and kinetics of the degradation of chitosan with different
449 deacetylation degrees under oxidizing atmosphere. *Thermochimica Acta*, 670, 18-
450 26.

451 Villar-Chavero, M. M., Domínguez, J. C., Alonso, M. V., Oliet, M., & Rodriguez, F.
452 (2019). Tuning the rheological properties of cellulosic ionogels reinforced with
453 chitosan: The role of the deacetylation degree. *Carbohydrate Polymers*, 207, 775-
454 781.

455 Villar-Chavero, M. M., Dominguez, J. C., Alonso, M. V., Rigual, V., Oliet, M., &
456 Rodriguez, F. (2019). Viscoelastic properties of physical cellulosic bionogels of
457 cholinium lysinate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 262-
458 269.

459 Yıldızhan, Ş., Çalık, A., Özcanlı, M., & Serin, H. (2018). Bio-composite materials: a short
460 review of recent trends, mechanical and chemical properties, and applications.
461 *European Mechanical Science*, 2(3), 83-91.

462

463

464

465

466

467

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Chitosan-reinforced cellulosic bionogels: viscoelastic and antibacterial properties

M. Mar Villar-Chavero*, Juan C. Domínguez, M. Virginia Alonso, Mercedes Oliet, Francisco Rodriguez

Chemical Engineering and Materials Department, Complutense University of Madrid, Av. Complutense S/N, 28040, Madrid, Spain

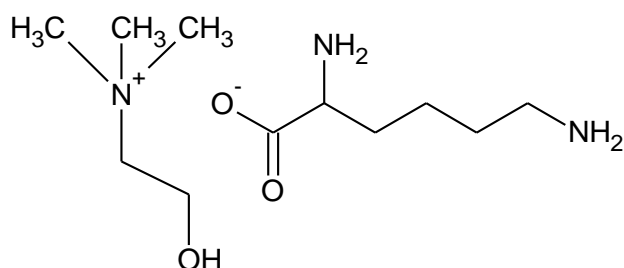


Fig. S1. Chemical structure of ChLys

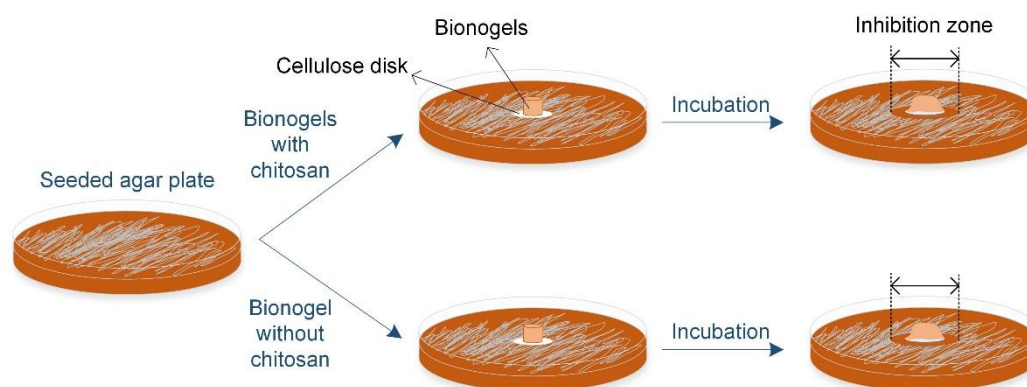


Fig. S2. Schematic of the antimicrobial test.

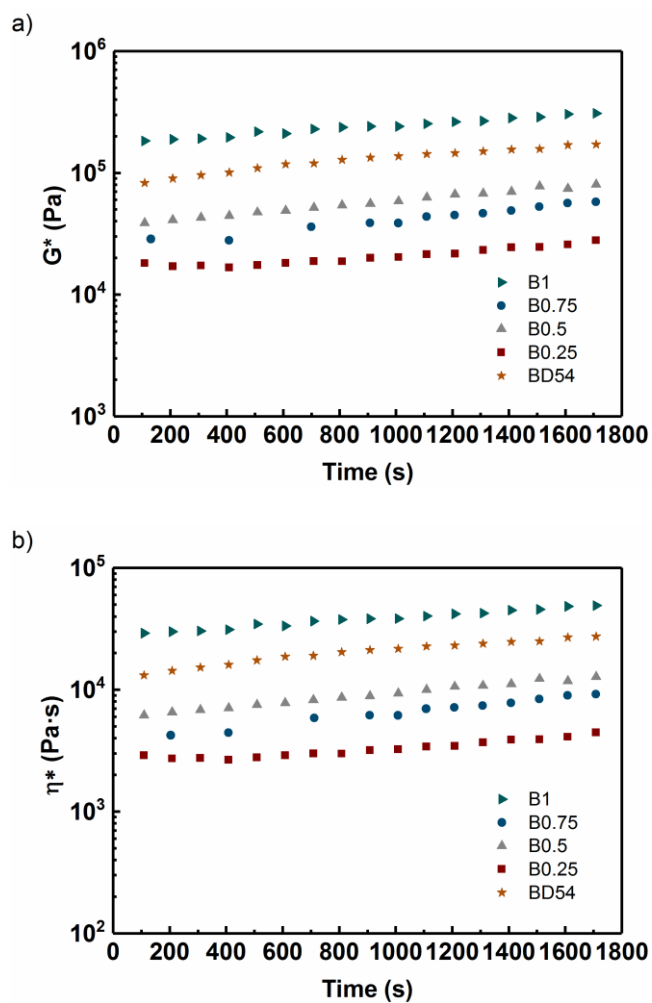


Figure S3. Spectra obtained by dynamic time sweep test at 25 °C, (a) the complex modulus, G^* , and (b) the complex viscosity, η^* .

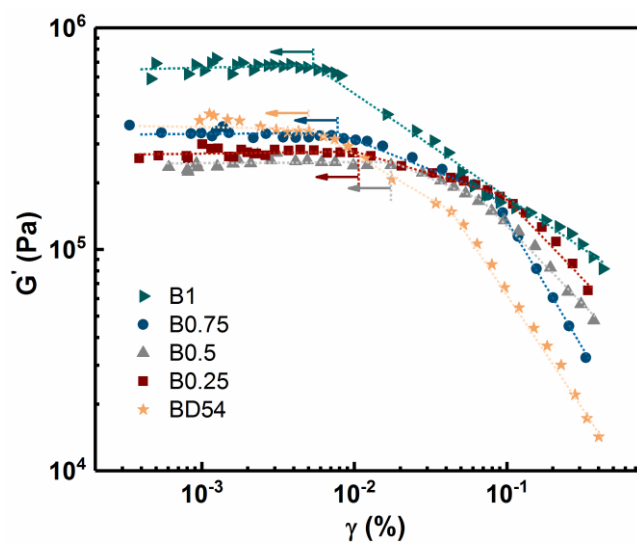


Figure S4. Spectra obtained by strain sweep test at 25 °C.

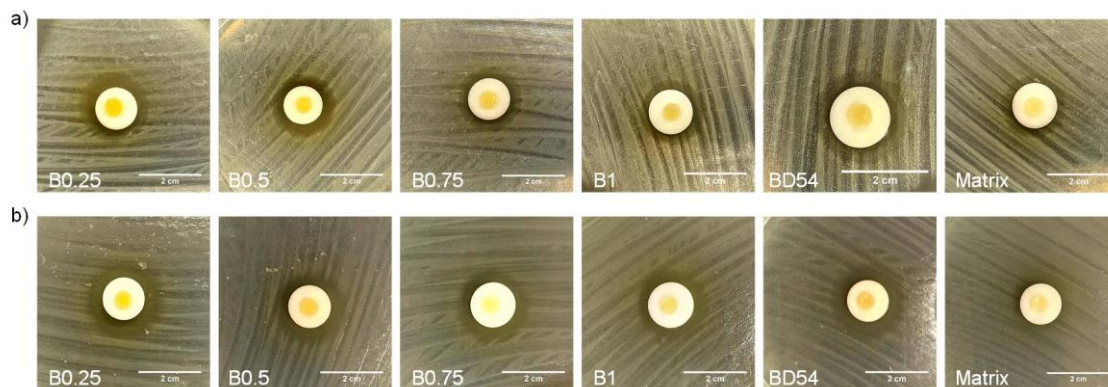


Fig. S5. Photographs of the antimicrobial tests of the chitosan-reinforced cellulosic bionogels against *S. aureus* (a) and *E. coli* (b) bacteria.

