



Universidad de Los Andes
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Laboratorio de Polímeros



Obtención de hidrogeles basados en caseína y genipina

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Licenciada en Química

Bra. Alix Bastidas.

Tutor:

Dr. Cristóbal Lárez Velásquez

Co-tutora:

Dra. Rosa Alba Vielma

Mérida, Abril 2015.

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

A Dios

A la Virgen

A mis Padres

A mis Hermanos

A mi Abuelita

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes.

Gracias a mis padres, por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación.

A mis hermanos y abuelita que me motivan y recuerdan que detrás de cada detalle existe el suficiente alivio para empezar nuevas búsquedas.

A la Universidad de Los Andes y a la Facultad de Ciencias que me dieron la oportunidad de formar parte de ellas, y que a través de los conocimientos impartidos por sus profesores me dieron la oportunidad de crecer profesionalmente.

Al Dr. Cristóbal Lárez por haberme brindado la oportunidad de desarrollar este trabajo bajo su tutoría y por la acertada orientación, el soporte y discusión crítica que me permitió un buen aprovechamiento del trabajo realizado.

A la Dra. Rosa Alba Vielma por su paciencia, entrega y valiosos consejos que permitieron alcanzar los objetivos de ésta tesis. Más que mi cotutora es una amiga que encontré en el camino.

A la M. Sc. Iris Santos, alguien que acompañó en logros y fracasos, celebró mis alegrías, y jamás juzgó mis errores; más que la técnica de un laboratorio es una amiga incondicional. Gracias por siempre estar allí y por ayudarme en todo sin pedir nada a cambio

Al Laboratorio de Polímeros y a todos sus integrantes en especial al M. Sc. Carlos Torres por su colaboración para la elaboración del análisis termogravimétrico.

Al Tec. Alexander Piña, técnico del laboratorio de biología 1, por su apoyo para la determinación de los pesos moleculares.

A la Lic. Maura Rojas, integrante del laboratorio de Enzimología de Parásitos, por la ayuda prestada para la elaboración de la electroforesis.

Al Tec. Jesús Pacheco, perteneciente al laboratorio de Biotecnología de Microorganismos “SIXTO DAVID ROJO” por su colaboración para la liofilización de las muestras.

Al Laboratorio de Alimentos de la Facultad de Farmacia, en especial a la TSU Leandra Rial y al Sr Javier Ruiz por la colaboración prestada durante mi permanencia en su laboratorio.

Al centro de microscopía electrónica de la Facultad de medicina, especialmente al Ing. Alirio y la Lic. Delcy Dávila por la realización de la microscopía electrónica.

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
3.1. <i>Generalidades de los polímeros</i>	5
3.1.1. <i>Clasificación de los polímeros</i>	5
3.1.2. <i>Hidrogeles</i>	6
3.1.3 <i>Hinchamiento de hidrogeles</i>	7
3.1.4. <i>Entrecruzamiento</i>	8
3.2. <i>Generalidades de las proteínas</i>	8
3.2.1. <i>Aminoácidos</i>	9
3.2.2. <i>Tipos de proteínas</i>	10
3.3. <i>Proteínas de la leche</i>	10
3.3.1. <i>Proteínas del suero</i>	11
3.3.2. <i>Caseínas</i>	11
3.3.3. <i>Tipos de caseínas</i>	11
3.4. <i>Espectroscopia</i>	12
3.4.1. <i>Espectroscopia infrarroja (IR)</i>	12
3.5. <i>Cromatografía</i>	12
3.5.1. <i>Electroforesis</i>	13
3.6. <i>Microscopía electrónica</i>	13
3.7. <i>Determinación de nitrógeno por el método de Kjeldahl</i>	14
3.8. <i>Análisis termogravimétrico</i>	14
4. ANTECEDENTES	17
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVOS	21
6.1. <i>Objetivo general</i>	21
6.2. <i>Objetivos específicos</i>	21
7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	23
7.1. <i>Materiales y equipos</i>	23
7.1.1. <i>Materiales</i>	23
7.1.2. <i>Reactivos y solventes</i>	23
7.1.3. <i>Equipos e instrumentos</i>	23
7.2. <i>Descripción de las técnicas a utilizar</i>	24
7.2.1. <i>Obtención de la genipina</i>	24

7.2.2. Extracción de la caseína	24
7.2.3. Caracterización de la caseína	26
7.2.4. <i>Preparación de hidrogeles de caseína/genipina</i>	28
7.2.5. Caracterización de los hidrogeles de caseína/genipina	29
7.2.6. Estudios de hinchamiento de los hidrogeles.....	29
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
8.1. <i>Obtención y caracterización de la genipina</i>	31
8.2. <i>Extracción y caracterización de la caseína</i>	32
8.3. <i>Preparación de hidrogeles de caseína/genipina</i>	36
8.4. <i>Caracterización de los hidrogeles de caseína/genipina</i>	38
8.5. <i>Estudios de hinchamiento de los hidrogeles</i>	43
9. CONCLUSIONES	53
10. RECOMENDACIONES	55
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÉNDICES	61

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Aminoácidos estándar.....	9
Tabla 2: Características de las caseínas.....	11
Tabla 3: Porcentaje de caseína en distintas especies.	12
Tabla 4: Reactivos y solventes comunes empleados durante el desarrollo del trabajo.....	23
Tabla 5: Equipos e instrumentos utilizados.....	24
Tabla 6: Soluciones estándar utilizadas en electroforesis.	27
Tabla 7: Preparación de geles de electroforesis SDS-PAGE (15%).	27
Tabla 8: Cantidades utilizadas para la preparación de hidrogeles en forma de discos.	28
Tabla 9: Asignación de las señales en el espectro de IRTF de la genipina utilizada.....	31
Tabla 10: Resultados obtenidos durante la extracción de la caseína.	33
Tabla 11: Determinación del porcentaje de nitrógeno y de proteína por el método de Kjeldahl manual.....	33
Tabla 12: Valores de Rf de proteínas de patrón de peso molecular en gel de electroforesis SDS-PAGE (figura 12, pozo 4).	34
Tabla 13: Asignación de las señales en el espectro de IRTF de la caseína extraída.	35
Tabla 14: Porcentajes de pérdida de masa durante la degradación térmica de los hidrogeles de caseína/genipina.....	41
Tabla 15: Porcentajes de pérdida de masa durante la degradación térmica de los hidrogeles de caseína/genipina liofilizados.	42
Tabla 16: Asignación de las señales en el espectro de IRTF del residuo del TGA de los hidrogeles.	43
Tabla 17: Clasificación del hinchamiento de los hidrogeles de CAS13/GEN4-D y CAS13/GEN6-D a los distintos valores de pH inicial del medio.....	48
Tabla 18: Clasificación del hinchamiento de los hidrogeles de CAS13/GEN4 y CAS13/GEN6 a los distintos valores de pH inicial del medio.....	48

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Estructura química de la genipina	3
Fig. 2: Estructura esquemática de los polímeros lineales, ramificados y entrecruzados.....	6
Fig. 3: Formación de un dipéptido.....	8
Fig. 4: Estructura general de un aminoácido estándar.....	9
Fig. 5: a) Cilindro graduado con leche descremada (izquierda) y lactodensímetro (derecha). b) Determinación de la densidad.....	25
Fig. 6: a) Sistema utilizado para la extracción de la caseína. b) Eliminación del sobrenadante, luego de la precipitación.....	25
Fig. 7: a) Inicio de la digestión b) Final de la digestión.....	26
Fig. 8: Preparación de las muestras para electroforesis.	27
Fig. 9: Elaboración de los hidrogeles en forma de esferas a partir de las mezclas de caseína/genipina estudiadas.....	28
Fig. 10: Espectro de IRTF obtenido para la genipina utilizada. Tomado como pastilla de KBr.	31
Fig. 11: Trazas de TGA y DTGA obtenidas para la genipina utilizada. Velocidad de barrido 10 oC/min. bajo flujo de nitrógeno (50 mL/min.)	32
Fig. 12: Gel de electroforesis SDS-PAGE de la Caseína: (1) Caseína 1-0,5 % 10 µL. (2) Caseína 2-0,5 % 10 µL (3) Caseína 3-0,5 % 10 µL. (4) Patrones de peso molecular. (5) Caseína 1-0,25 % 10 µL. (6) Caseína 2-0,25 % 10 µL. (7) Caseína 3-0,25 % 10 µL. (8) Caseína 1-0,1 % 25 µL. (9) Caseína 2-0,1 % 25 µL. (10) Caseína 3-0,1 % 25 µL.....	34
Fig. 13: Curva de calibración de proteínas estándar en gel de electroforesis SDS-PAGE.	34
Fig. 14: Espectros IR de las muestras de caseína obtenidas.	35
Fig. 15: Trazas de TGA y DTGA para la caseína extraída (Caseína 2). Velocidad de barrido 10 oC/min. bajo flujo de nitrógeno (50 mL/min.)	36
Fig. 16: Cambios de coloración observados durante la reacción de entrecruzamiento de los hidrogeles de caseína/genipina con diferentes concentraciones de genipina: a) CAS13/GEN1,5; b) CAS13/GEN3; c) CAS13/GEN4; d) CAS13/GEN6.....	37
Fig. 17: Fotografías que muestra los distintos colores de los estadíos alcanzado durante la reacción antes de la formación de esferas de caseína/genipina.....	38
Fig. 18: Formación de esferas dejando caer las gotas de la mezcla de caseína/genipina en HCl concentrado.....	38
Fig. 19: Esferas de caseína al inicio y al final de la reacción (a y c), respectivamente y de CAS13/GEN6 (b y d), respectivamente al inicio y al final de la reacción.....	38
Fig. 20: Traza de TGA del hidrogel de CAS13/GEN6-D. Velocidad de barrido 10 °C/min. bajo flujo de nitrógeno (50 mL/min.)	39
Fig. 21: Traza de TGA para el hidrogel de CAS13/GEN6 conservado en alcohol. Velocidad de barrido 10 °C/min. bajo flujo de nitrógeno (50 mL/min.)	40
Fig. 22: Traza de TGA del hidrogel de CAS13/GEN6-D luego de alcanzar su hinchamiento de equilibrio en medio acuoso a pH 12. Velocidad de barrido 10 °C/min. Bajo flujo de nitrógeno (50 mL/min.).....	40
Fig. 23: Trazas de TGA de los hidrogeles liofilizados. Velocidad de barrido 10 °C/min. Bajo flujo de nitrógeno (50 mL/min.)	41

Fig. 24: Espectro IR de los residuos de TGA obtenidos para los distintos hidrogeles.....	42
Fig. 25: (a) Comportamiento en el tiempo de los hidrogeles de CAS13/GEN4 para los diferentes valores de pH inicial del medio de hinchamiento (b) Ampliación de la zona inicial del estudio anterior (T = 4 °C)	44
Fig. 26: Hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6 en medios acuosos a diferentes valores de pH. T = 4 °C)...	45
Fig. 27: Hinchamiento máximo de los hidrogeles de CAS13/GEN4 y CAS13/GEN6 en función del pH inicial del medio de hinchamiento (T =4 °C).....	45
Fig. 28: Hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4-D en medios acuosos a diferentes valores de pH (T =4 °C)	46
Fig. 29: Hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6-D en medios acuosos a diferentes valores de pH (T =46 °C)	46
Fig. 30: Hinchamiento máximo de los hidrogeles de CAS13/GEN4-D y CAS13/GEN6-D en función del pH inicial del medio de hinchamiento (T =4 °C).....	47
Fig. 31: Hinchamiento máximo de los hidrogeles con respecto al pH final a diferentes concentraciones, luego de dializar.	47
Fig. 32: Fotografías de hidrogeles liofilizados tomadas en un microscopio óptico: a) CAS13/GEN6-etanol. b) CAS13/GEN-etanol. c) CAS13/GEN6-D. d) CAS13/GEN6-pH 12. e) CAS13/GEN4-pH 12.....	49
Fig. 33: Micrografías MEB de los hidrogeles conservados en alcohol y luego liofilizados: a) Hidrogel CAS13/GEN6-etanol. b) CAS13/GEN4-etanol.....	49
Fig. 34: Micrografía MEB del hidrogel CAS13/GEN6-D.	50
Fig. 35: Micrografías MEB del hidrogel CAS13/GEN6-pH 12 a diferentes aumentos: a) 170 aumentos. b) 700 aumentos. c) 1300 aumentos.....	50
Fig. 36: Micrografías MEB del hidrogel CAS13/GEN4-pH 12 a diferentes aumentos: a) 170 aumentos. b) 700 aumentos. c) 1300 aumentos.....	51

www.bdigital.ula.ve

1. RESUMEN

Se presentan los resultados obtenidos durante la extracción de la caseína a partir de leche de vaca comercial (PROGAL, Santa Rosa, Mérida) mediante precipitación en su punto isoeléctrico. A la caseína así obtenida se le realizaron estudios de caracterización fisicoquímica mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (IRTF), determinación del porcentaje de nitrógeno por el método de Kjeldahl micro-manual, determinación del porcentaje de proteínas, electroforesis y análisis termogravimétrico (TGA); posteriormente fue utilizada para la elaboración de hidrogeles en forma de esferas, los cuales se entrecruzaron químicamente con el entrecruzante natural genipina obtenido a partir de los frutos del caruto (*Genipa americana L*). Para la preparación de los hidrogeles se ensayaron distintas concentraciones del agente entrecruzante, lo cual conduce a distintos grados de entrecruzamiento. Los hidrogeles así obtenidos fueron estudiados gravimétricamente en relación a su hinchamiento en medio acuoso a diferentes valores de pH (desde 2 hasta 12). En los estudios de hinchamiento en medio acuoso se encontró que el grado de hinchamiento depende tanto del grado de entrecruzamiento como del pH del medio. Los resultados obtenidos apuntan hacia un comportamiento clásico de hinchamiento para estos materiales, especialmente para los ensayados en condiciones donde éstos logran mayores grados de ionización (medios de hinchamiento a pH 11 y 12), con grados más bajos de hinchamiento a mayores porcentajes del agente entrecruzante. Los resultados de los estudios por microscopia electrónica de barrido de estos materiales apuntaron en el mismo sentido.

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

2. INTRODUCCIÓN

Desde inicios de la segunda guerra mundial el desarrollo de nuevas tecnologías, materiales y aplicaciones de los polímeros, sufrió un gran avance [1]. La industria de los polímeros ha crecido enormemente y si bien en sus comienzos buscó sustituir o imitar polímeros naturales de importancia comercial, posteriormente se abocó al diseño de polímeros con características diferentes y más ventajosas que la de los polímeros naturales [2]. Los materiales poliméricos, tanto de origen natural como de origen sintético, han sido utilizados con éxito en el desarrollo de formulaciones de dosificación de medicamentos, de tal forma que han llegado a constituir uno de los aspectos claves en el diseño de éstos biomateriales [3].

Resumir las aplicaciones actuales de los polímeros resulta una tarea casi imposible; los polímeros sintéticos han ocupado todos los ámbitos del desarrollo y la elaboración de productos manufacturados, sustituyendo materiales utilizados tradicionalmente, tales como la madera, metales y materiales cerámicos. Así, por ejemplo, estos materiales encuentran aplicación en campos tan diversos como la medicina, ingeniería, agricultura, entre otros [1]. Anteriormente, la mayoría de las polimerizaciones se realizaban a través de reacciones clásicas, como polimerizaciones por adición o condensación. Sin embargo, en los últimos años se ha utilizado la adición de agentes entrecruzantes a polímeros naturales, con el fin de obtener materiales con mejores propiedades [4,5].

Los agentes entrecruzantes son moléculas en las cuales están presentes al menos dos grupos funcionales reactivos, que permiten la formación de enlaces covalentes entre las cadenas poliméricas [6]. Entre los agentes entrecruzantes mas comunes se encuentran los dialdehídos, como es el caso del glioxal y del glutaraldehído, la enorme desventaja que presentan este tipo de entrecruzantes, es que son considerados como reactivos tóxicos. En tal sentido, se ha considerado la utilización de agentes entrecruzantes, naturales tales como la genipina [6,7].

La genipina es un reactivo natural extraído de los frutos de la gardenia (*Gardenia jasminoides*) y del caruto (*Genipa americana* L), y surge como una alternativa a los agentes entrecruzantes convencionales, debido a su buena biocompatibilidad y ausencia de toxicidad [6].



Fig. 1: Estructura química de la genipina

La genipina tiene la capacidad de reaccionar de forma espontánea con aminoácidos y proteínas que contengan aminas primarias, por ello, ha sido usada para elaboración de hidrogeles mediante el entrecruzamiento de proteínas con ésta.

Los hidrogeles son materiales que por sus características despiertan en este campo un enorme interés. Estos materiales son capaces de absorber grandes cantidades de agua, pero son insolubles en ella debido a la existencia de una red o malla tridimensional en su estructura [3]. Este comportamiento característico permite que sean utilizados en diversas aplicaciones científicas e industriales. De particular importancia es su utilización para la liberación controlada de fármacos [8].

Por tales razones, en este trabajo se plantea la utilización de dos materiales de partida naturales como la caseína y la genipina, para la elaboración de hidrogeles que pudieran tener propiedades mecánicas adecuadas y posean altos grados de hinchamiento [6].

www.bdigital.ula.ve

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1. Generalidades de los polímeros

La palabra polímero define toda sustancia constituida por moléculas que se caracterizan por la repetición de uno o más tipos de unidades monoméricas. Se trata de cadenas muy largas (o también redes) en las que muchas de estas llamadas unidades repetitivas están alineadas unas junto a otras. Los monómeros son, por tanto, sustancias químicas de bajo peso molecular capaces de reaccionar consigo mismo o con otras sustancias para formar un polímero [9]. Generalmente, una molécula de polímero está constituida por una cadena ininterrumpida de unidades repetitivas (esqueleto o cadena principal) de la cual cuelgan, a menudo, otros grupos de átomos periféricos (grupos laterales o grupos colgantes) [10].

3.1.1. Clasificación de los polímeros

Los polímeros deben considerarse como un concepto amplio, en el que cabe un buen número de materiales. Dentro de este numeroso grupo, se puede hacer diferentes clasificaciones, atendiendo siempre a diversos criterios [11]. Es por ello, que se presenta la siguiente clasificación:

Por su composición

Homopolímeros: son macromoléculas compuestas por un solo tipo de unidades constitucionales repetitivas (ucr) que se unen a través de un mecanismo de polimerización único. Por ejemplo, el poli(etileno), poli(estireno), etc.

Copolímeros: son macromoléculas formadas por más de una ucr, las cuales pueden distribuirse a lo largo de la cadena de diversas maneras, tales como: alternadas, al azar, en bloque y de injerto.

Copolímeros alternado

-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-

Copolímeros al azar

-A-A-B-A-B-B-B-A-A-B-A-B-

Copolímeros en bloque

-A-A-A-A-A-B-B-B-B-B-B-

Copolímeros de injerto

```

      |           |
      B           B
      |           |
      B           B
      |           |
      B           B
      |           |
-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-
      |
      B
      |
      B
      |
      B
      |
  
```

Por su origen

Naturales: son sustancias químicas producidas por organismos vivos que se emplean sin modificación, es decir, se pueden presentar en la naturaleza (reino vegetal y animal), por ejemplo: la celulosa, el caucho natural, las resinas, etc.

Semi-sintéticos: son compuestos obtenidos por la transformación química de los polímeros naturales, sin que se destruya de modo apreciable su naturaleza macromolecular, por ejemplo la seda artificial (rayón viscosa) obtenida a partir de la celulosa.

Sintéticos: son macromoléculas creadas por el hombre que se obtienen por vía sintética a partir de sustancias de bajo peso molecular; los polímeros sintéticos se dividen en termoplásticos, que se ablandan o funden al calentarse, y termorrígidos que se descomponen al ser calentados y no pueden fundirse ni solubilizarse. Por ejemplo, la baquelita.

Por su estructura molecular

Lineales: son macromoléculas formadas por monómeros difuncionales, en las cuales no existen ramificaciones de la cadena principal, excepto aquellas derivadas de los grupos laterales presentes en la ucr.

Ramificados: son polímeros formados con la incorporación adicional de monómeros trifuncionales y están formados por una cadena principal de la cual surgen de manera estocástica ramificaciones más o menos largas, generalmente de constitución similar a la cadena principal.

Entrecruzados: se forman cuando las cadenas laterales presentes en la cadena principal unen covalentemente dos o más cadenas distintas, de manera que todo el sistema se puede considerar como una sola macromolécula [12,1].

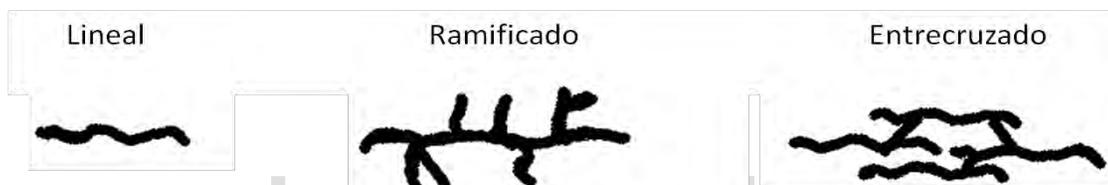


Fig. 2: Estructura esquemática de los polímeros lineales, ramificados y entrecruzados.

3.1.2. Hidrogeles

Los hidrogeles son materiales poliméricos entrecruzados en forma de red tridimensional, de origen natural o sintético, que se hinchan en contacto con el agua formando materiales blandos y elásticos, y que retienen una fracción significativa de la misma en su estructura (sin disolverse) [13]. Además, pueden llegar a poseer gran resistencia mecánica según el método con el que se obtengan [14].

Los hidrogeles pueden clasificarse de varias formas, dependiendo de las características y propiedades que se tomen como referencia.

Con base en la naturaleza de su carga iónica

Pueden clasificarse en neutros o iónicos (aniónicos, catiónicos, anfóteros).

Dependiendo del método de preparación

Homopolimérico: producidos por el entrecruzamiento de un tipo de unidad monomérica con carácter hidrofílico.

Copolimérico: producidos por el entrecruzamiento de dos unidades comonoméricas, poseyendo al menos una de ellas carácter hidrofílico.

Multipolimérico: se produce al hacer reaccionar tres o más comonomeros juntos.

Polimérico interpenetrado: producido por la preparación de una primera red que está hinchada y un monómero; este último reacciona para formar una segunda estructura de red intercalada [15].

Con base en su arreglo cristalino

Amorfos: las cadenas macromoleculares están dispuestas al azar.

Semicristalinos: se caracterizan por regiones densas de cadenas macromoleculares ordenadas, por ejemplo, los hidrogeles con enlaces de hidrogeno donde los hidrógenos pueden ser responsables de la estructura tridimensional formada.

Actualmente, los hidrogeles han sido utilizados en el campo biomédico para aplicaciones temporales, ya que algunos de ellos tienen la capacidad de ser compatibles con el tejido humano y de degradarse cierto tiempo después de ser implantados, dando lugar a productos que no son tóxicos y que pueden ser eliminados por el organismo o metabolizado por éste [16, 17]. Más específicamente, se han usado en la medicina como sistemas de liberación controlada de fármacos y/o sostenida de principios activos, dispositivos para diagnóstico, sustrato para el cultivo de células, geles para electroforesis, desintoxicantes sanguíneos, entre otros [18].

3.1.3 Hinchamiento de hidrogeles

Una red polimérica tridimensional puede absorber una gran cantidad de agua o fluido con el que se ponga en contacto, es decir, puede hincharse. Durante el hinchamiento, las cadenas que conforman la red asumen una configuración elongada, esta configuración va acompañada de la aparición de una fuerza retráctil en oposición al proceso de hinchamiento, que actúan como una presión que las cadenas de la malla ejercen sobre el disolvente contenido en ella. A medida que la malla se hincha con el disolvente aumenta dicha presión elástica y el hinchamiento alcanza su valor máximo o de equilibrio cuando se obtiene un balance entre ambas fuerzas [13].

En función de la naturaleza de la red tridimensional que los constituyen, los hidrogeles se pueden clasificar en dos tipos: los geles físicos, que presentan una red tridimensional formada por uniones no covalentes (que no son completamente estables) y los geles químicos, que son aquellos en los que la red está formada mediante enlaces covalentes. Desde el punto de vista del hinchamiento, en los geles físicos la entrada de líquido puede desenmarañar las cadenas, separándolas debido a que las fuerzas de origen físico que las mantienen unidas son débiles, mientras que en los geles químicos la entrada de líquido no puede separar las cadenas por estar covalentemente unidas [13,19].

La relación de entrecruzamiento es uno de los factores más importantes que afectan el hinchamiento de un hidrogel y se define como la relación entre los moles de agente entrecruzante y los moles de las unidades repetitivas de monómero. A mayor entrecruzamiento menor es la movilidad de las cadenas de polímero, por lo que disminuye el hinchamiento. La estructura molecular del polímero también puede afectar al hinchamiento. Los hidrogeles que contengan mayor número de grupos hidrófilos en su estructura tendrán mayor hinchamiento que aquellos que contengan grupos hidrófobos [20].

La cantidad de agua retenida dentro de un hidrogel en el equilibrio, puede expresarse de varias formas:

Porcentaje de agua en peso:

$$\%A = \frac{\text{peso húmedo} - \text{peso seco}}{\text{peso húmedo}} \times 100 \quad (1)$$

Porcentaje de hidratación o índice de hinchamiento en peso:

$$\%H = \frac{\text{peso húmedo} - \text{peso seco}}{\text{peso seco}} \times 100 \quad (2)$$

Grado de hinchamiento en peso:

$$Dhh = \frac{\text{peso húmedo}}{\text{peso seco}} \quad (3)$$

3.1.4. Entrecruzamiento

Una forma de hacer más rígidos a los polímeros es introduciendo enlaces químicos entre las cadenas poliméricas; la formación de este tipo de enlaces se denomina entrecruzamiento. Cuanto mayor es el grado de entrecruzamientos de un polímero más rígido será el material [21]. Este proceso puede ocurrir química y físicamente. El entrecruzamiento químico involucra la formación de enlaces covalentes entre las cadenas y puede lograrse empleando monómeros multifuncionales a bajas concentraciones o mediante el acoplamiento de radicales generados por radiación. En contraste, el entrecruzamiento físico se debe a interacciones secundarias no covalentes como enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas hidrófobas o interacciones dipolo-dipolo [22].

El entrecruzamiento puede ocurrir durante el proceso de polimerización o después de éste, mediante reacciones químicas diversas. Una de las aplicaciones más relevantes de los polímeros entrecruzados es su empleo en la fabricación de diversos enseres tales como mangos de utensilios de cocina, envases de comida, etc. [1].

En los últimos años se ha utilizado el entrecruzamiento de proteínas muy frecuentemente a fin de poder desarrollar biomateriales cada vez más adecuados y funcionales en el área de prótesis y de liberación de medicamentos. La albumina, las lactoglobulinas, el colágeno y la caseína son las proteínas más utilizadas en este tipo de estudios.

3.2. Generalidades de las proteínas

Las proteínas son biopolímeros de α -aminoácidos, denominados así porque el grupo amino está enlazado al átomo de carbono α , átomo más próximo al carbonilo. Las proteínas son las moléculas más abundantes en los animales y juegan un papel importante en todos los aspectos de la estructura y funciones de las células. En las proteínas, los aminoácidos se encuentran unidos linealmente por medio de uniones peptídicas [23].

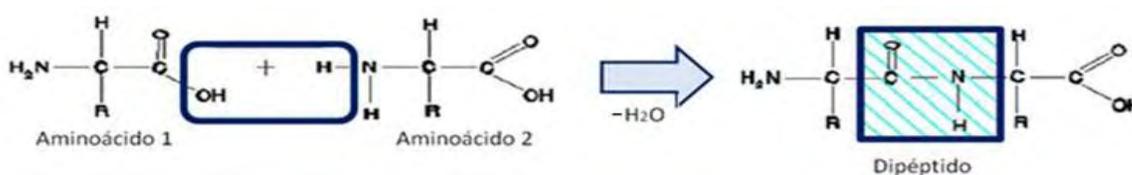


Fig. 3: Formación de un dipéptido [19].

La formación del enlace peptídico entre dos aminoácidos es un ejemplo de una reacción de condensación. Dos moléculas se unen mediante un enlace de tipo covalente CO-NH con la pérdida de una molécula de agua y el producto de esta unión es un dipéptido (figura 3). El grupo carboxilo libre del dipéptido reacciona de modo similar con el grupo amino de un tercer aminoácido, y así sucesivamente, hasta formar una larga cadena. Siempre habrá un extremo NH_2 terminal y un COOH terminal.

3.2.1. Aminoácidos

El término aminoácido define a cualquier molécula que contiene un grupo amino y un grupo ácido en su estructura. En el caso de los denominados aminoácidos estándar se diferencian solo en la naturaleza química de la cadena lateral o grupo R (figura 4). Por ello, las propiedades fisicoquímicas como la carga neta, solubilidad, reactividad química y las posibilidades de establecer enlaces de hidrógeno solo dependen de ella [23,24].

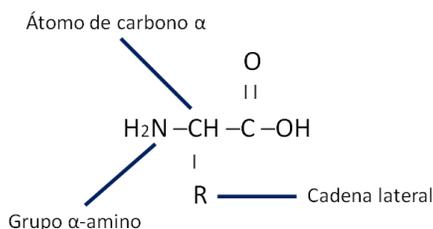


Fig. 4: Estructura general de un aminoácido estándar.

En la tabla 1 se muestran los veinte α -aminoácidos (esenciales y no esenciales), considerados estándar debido a que prácticamente se encuentran en todas las proteínas.

Tabla 1: Aminoácidos estándar [23].

Nombre	Símbolo	Abreviatura	Grupo funcional de la cadena lateral	Punto isoeléctrico
Glicina	G	Gly	Ninguno	6.0
Alanina	A	Ala	Grupo alquilo	6.0
Valina	V	Val	Grupo alquilo	6.0
Leucina	L	Leu	Grupo alquilo	6.0
Isoleucina	I	Ile	Grupo alquilo	6.0
Fenilalanina	F	Phe	Grupo aromático	5.5
Prolina	P	Pro	Estructura cíclica rígida	6.3
Serina	S	Ser	Grupo hidroxilo	5.7
Treonina	T	Thr	Grupo hidroxilo	5.6
Tirosina	Y	Tyr	Grupo -OH fenólico	5.7
Cisteína	C	Cys	Tiol	5.0
Metionina	M	Met	Sulfuro	5.7
Asparagina	N	Asn	Amida	5.4
Glutamina	Q	Gln	Amida	5.7
Triptófano	W	Trp	Indol	5.9
Ácido aspártico	D	Asp	Ácido carboxílico	2.8
Ácido glutámico	E	Glu	Ácido carboxílico	3.2
Lisina	K	Lys	Grupo amino	9.7
Arginina	R	Arg	Grupo guanidino	10.8
Histidina	H	His	Anillo de imidazol	7.6

Además de los aminoácidos esenciales y no esenciales, en las proteínas se encuentran otros aminoácidos en pequeñas proporciones, que son formas hidroxiladas de aminoácidos estándar. Se denominan aminoácidos raros, a pesar de que frecuentemente se encuentran en el colágeno.

3.2.2. Tipos de proteínas

Dada la gran variedad de estructuras químicas a la que puede dar lugar una secuencia aperiódica de veinte aminoácidos distintos, es muy difícil hacer una clasificación de las proteínas. Sin embargo a continuación se presentan algunos criterios de clasificación.

Por su interés en nutrición, resulta más fácil clasificarlas desde el punto de vista estructural:

Proteínas globulares: su nombre se debe a que su estructura terciaria y cuaternaria mantiene las cadenas de polipéptidos plegadas, formando estructuras compactas de aspecto esférico o globular; además, se caracterizan por ser solubles en agua y por intervenir en el metabolismo como hormonas o enzimas. Entre ellas se encuentran la caseína de la leche, la albumina del huevo y las globulinas de la sangre.

Proteínas fibrosas: tienen un aspecto alargado y fino debido a que las cadenas polipeptídicas se ordenan preferentemente extendidas de modo paralelo a lo largo de un eje, formando así fibras o laminas largas. Generalmente, son resistentes, insolubles en agua o en disoluciones salinas diluidas y en su mayoría son más difíciles de digerir. Entre ellas se encuentran la queratina, el colágeno y la miosina [25].

Según su composición se pueden clasificar en:

Simple u holoproteínas: son aquellas que por hidrólisis total dan α -aminoácidos, o sus derivados. Se distinguen entre sí en función de sus propiedades físicas y químicas. Dentro de las proteínas simples se encuentran las albuminas, globulinas, glutelinas, prolaminas, protaminas, histonas y escleroproteínas (colágeno, elastina, queratina).

Conjugadas o heteroproteínas: son aquellas que por hidrólisis no solo producen aminoácidos sino también otros componentes orgánicos o inorgánicos. Las proteínas conjugadas se clasifican de acuerdo a la naturaleza de su grupo prostético en: nucleoproteínas, lipoproteínas, fosfoproteínas, cromoproteínas, metaloproteínas, hemoproteínas y flavoproteínas.

Según su función se clasifican en:

Enzimas: catalizan las reacciones químicas del organismo (nicotinamida, rivoflanina, tiamina, entre otras).

Proteínas de transporte: encargadas de llevar algunos compuestos de un sitio a otro en el organismo (albúmina, hemoglobina y lipoproteína).

Proteínas de reserva: caseína de la leche o albumina del huevo.

Proteínas reguladoras: hormonas (insulina y hormona del crecimiento).

Proteínas estructurales y de soporte: colágeno, elastina y queratina.

Proteínas contráctiles: actina, miosina o tubulina.

Proteínas con función defensiva: anticuerpos, fibrinógeno o trombina.

Protorreceptores: rodopsina de la retina [15,26].

3.3. Proteínas de la leche

Las proteínas de la leche (supone un 3-4% del peso total) poseen un alto valor biológico y nutritivo, están formadas principalmente por caseínas (aproximadamente 80%) y por las proteínas del suero.

Las caseínas, constituidas por varias fracciones (α , β , κ - caseínas), aparecen en forma de micelas formadas por complejos macromoleculares de fosfoproteínas y glicoproteínas en suspensión coloidal, mientras que las proteínas del suero son proteínas solubles, principalmente albúminas y globulinas [27].

3.3.1. Proteínas del suero

Las proteínas del suero suponen del 15 al 20% de las proteínas lácteas, permanecen normalmente aisladas y no participan en la coagulación enzimática, principalmente albúmina y globulinas, destacando el contenido en α -lactoglobulina, β -lactoglobulina y seroalbúmina. La β -lactoglobulina y la α -lactoglobulina tienen la estructura típica de todas las proteínas globulares, presentan una carga neta negativa al pH de la leche. La secuencia de distribución de los residuos hidrófobos, polares y cargados es bastante uniforme. Es por ello que estas proteínas se pliegan intramolecularmente y no se producen interacciones autoasociativas con otras proteínas [28]. El valor nutritivo de las proteínas del suero es alto, sobre todo su contenido en lisina y aminoácidos azufrados, por lo que se emplea ampliamente en la industria alimentaria [28].

3.3.2. Caseínas

La caseína o caseínas, son un grupo de proteínas que constituyen aproximadamente el 80% del total de las proteínas de la leche. Son proteínas fosforadas que entran dentro de la definición de las globulinas, son solubles y poseen una gran capacidad de retención de agua. La leche bovina contiene cuatro caseínas diferentes α_{s1} , α_{s2} , β y κ que se diferencian en su peso molecular y en la cantidad de grupos fosfatos que llevan unidos (tabla 2). Estas proteínas poseen carácter ácido, ya que son ricas en ácido glutámico y aspártico [29]. En la Tabla 2 se muestra el porcentaje de caseína para la leche de diferentes especies.

Tabla 2: Características de las caseínas [29].

Tipo de caseína	Peso Molecular (Da)	Grupos fosfato/molécula
Caseína α	27300	9
Caseína β	24100	4 a 5
Caseína κ	8000	1,5

3.3.3. Tipos de caseínas

Caseína α_{s1} : en la caseína α_{s1} la localización de las cargas y de las cadenas laterales hidrófobas es muy irregular. Eso le confiere a la molécula un comportamiento dipolar con un polo globular mucho más hidrófobo y un polo cargado. La caseína α_{s1} no se comporta como una proteína globular, esto se debe a los grupos ácidos fuertemente solvatados, que le confieren a la molécula su comportamiento de proteína desnaturalizada.

Caseína α_{s2} : de todas las caseínas, es la caseína más hidrófila ya que tiene hidrofobicidad próxima a la de las proteínas globulares, esto se deriva de su alto nivel de fosforilación.

Caseína β : posee un contenido de prolina acusadamente alto, que se encuentra repartido a lo largo de la cadena peptídica lo que hace improbable la presencia de estructuras ordenadas, además de ello posee carácter anfipolar, es decir, puede ser hidrófoba o hidrófila.

Caseína κ: contiene una parte glucídica compuesta de galactosa, N-acetilgalac-tosamina y ácido N-acetilneuramínico unida a la proteína mediante enlace O-glicosídico. Al igual que la caseína β posee carácter anfipolar.

Tabla 3: Porcentaje de caseína en distintas especies [30].

Especie	Caseína α_{s1}	Caseína α_{s2}	Caseína β	Caseína κ
Cabra	5 a 17	6 a 20	50	15
Vaca	38	10	40	12
Humana	Trazas	Trazas	70	27

3.4. Espectroscopia

3.4.1. Espectroscopia infrarroja (IR)

La espectroscopia infrarroja es una técnica que envuelve transiciones entre los niveles de energía vibracional de una molécula, la cual permite identificar los grupos funcionales con base en su longitud de onda de absorción, característica de cada grupo funcional. La región infrarrojo (debajo del rojo, del Latín infra, debajo) corresponde a frecuencias que se encuentran justo por debajo del visible y por encima de la microondas. En el espectro electromagnético, la región IR comprende el IR cercano ($14290-4000\text{ cm}^{-1}$), la región del IR fundamental ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) y la región del IR lejano ($600-200\text{ cm}^{-1}$) [31,32].

Cuando una sustancia absorbe radiación electromagnética de la región IR, la energía absorbida provoca vibraciones de los enlaces covalentes que unen a los átomos de las moléculas, los cuales se estiran o se encojen como resortes o flexionan como tijeras. Se pueden generar dos tipos principales de vibraciones moleculares: vibraciones de tensión y vibraciones de flexión [32].

La espectroscopia IR registra los cambios de vibraciones de tensión y flexión cuando la molécula absorbe energía electromagnética de la frecuencia del IR. Cuando el campo eléctrico tiene el mismo sentido que el momento dipolar, el enlace se comprime y el momento dipolar disminuye, cuando el campo es opuesto al momento dipolar, el enlace se alarga y el momento dipolar aumenta. Si esta compresión y alargamiento del enlace se produce a una frecuencia que corresponde a la velocidad de vibración de la molécula, se puede absorber energía. Por lo tanto, si las vibraciones modifican el momento dipolar de la molécula ($\mu > 0$), se originaran bandas de absorción al IR. Si por el contrario no hay una modificación en el momento dipolar ($\mu = 0$) no se registrarán bandas de absorción, es decir, serán inactivas al IR [23, 32].

3.5. Cromatografía

La cromatografía es un poderoso método de separación que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia; agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite a los científicos separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas. La palabra cromatografía proviene del griego chroma = color y graphein = escribir. Fue usada por primera vez en 1906 por Miguel Tswett, botánico ruso, para describir la separación de pigmentos vegetales en distintas zonas coloreadas [35].

En todas las separaciones cromatográficas la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos

fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cuantitativamente y/o cualitativamente [36, 37].

3.5.1. Electroforesis

La electroforesis es un método analítico–semipreparativo en el que se separan biomoléculas, en dependencia de su carga, entre otros factores, y bajo la acción de un campo eléctrico. En este sentido, es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; las partículas migran hacia el cátodo o ánodo en combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y biomoléculas [38].

Las moléculas se mueven hacia el ánodo o el cátodo a una velocidad denominada “velocidad de migración” de la molécula, la cual depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga/peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis [38,28].

La velocidad de migración (V) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva (q) y el gradiente de potencial eléctrico (E) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo a la talla y forma de la molécula, o sea, a la resistencia que le ofrece al medio [38].

$$V = q \cdot E / f$$

Una de las aplicaciones de la electroforesis ha sido la separación de moléculas biológicas, entre otras, las de bajo peso molecular tales como aminoácidos, pequeños péptidos y nucleótidos y las de alto peso molecular tales como las proteínas y polinucleótidos, incluyendo moléculas de RNA y DNA [39].

3.6. Microscopía electrónica

La microscopía es un conjunto de técnicas de aplicación y utilización de un microscopio. Existen diversos tipos de microscopía dentro de los cuales se tienen la microscopía óptica y la electrónica. La primera es una técnica utilizada para obtener una imagen ampliada de pequeñas muestras mediante el empleo de la luz visible, mientras que la segunda es una técnica semejante a la microscopía óptica, pero emplea haces de electrones en vez de luz [40]. Los principales tipos de microscopía electrónica son microscopía electrónica de transmisión (MET), microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía electrónica de túnel de barrido (MTB) [41].

La MET explora la microestructura con haces de electrones y registra la intensidad de los electrones transmitidos por la muestra, esta técnica da una imagen de alta resolución de las microestructuras estudiadas [40]. En la MET el preparado está interpuesto en el trayecto de un haz de electrones con una longitud de onda de 0,005 nm. La imagen se forma por la dispersión de los electrones que colisionan con el núcleo atómico y con sus electrones; la dispersión de los electrones depende tanto del espesor del objeto como de su densidad molecular. La imagen formada se registra por proyección sobre una pantalla fluorescente o sobre una película fotográfica debido a que el rayo de electrones es invisible [41,42]. En este tipo de microscopía los haces no solo son capaces de proporcionar información cristalográfica sobre la superficie de las nanopartículas, sino también se pueden utilizar para producir imágenes de las superficies [43].

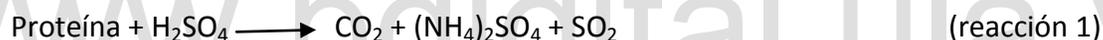
Por otro lado, la MEB explora microestructuras con un haz de electrones que barre la superficie de la muestra, consiguiéndose una alta resolución y una gran profundidad de campo, permite estudiar la morfología superficial [40]. En el microscopio electrónico de barrido, los electrones no atraviesan el objeto, sino que la imagen se forma indirectamente cuando un fino haz de electrones recorre la superficie de la preparación (barrido) que está recubierta por una delgada capa de un metal pesado. La emisión de los electrones bombardeados se mide con un detector ubicado cerca del preparado y adaptado a una pantalla de televisor. La imagen así obtenida se puede visualizar en forma directa sobre la pantalla o registrarse en película fotográfica o en forma digital [41].

3.7. Determinación de nitrógeno por el método de Kjeldahl

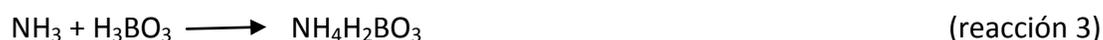
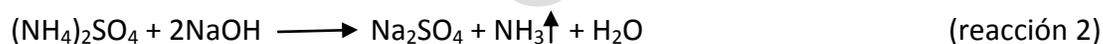
El método de Kjeldahl es uno de los métodos más exactos para determinar nitrógeno en sustancias como proteínas. Todas las proteínas, vegetales o animales, contienen nitrógeno amínico, el cual es nitrógeno unido a dos átomos de hidrógeno y a uno de carbono $-C-NH_2$. El nitrógeno en esta forma se determina por el método de Kjeldahl, y a partir del resultado, se calcula el contenido de proteínas multiplicando por un factor apropiado [44].

El proceso consiste en digerir la muestra en ácido sulfúrico a ebullición (reacción 1), que convierte el nitrógeno en ion amonio, y oxida los demás elementos presentes. Luego se neutraliza el ácido y se añade exceso de álcali, a continuación, se destila el amoniaco recogiendo sobre un volumen medido de disolución valorada de ácido (reacciones 2 y 3) y finalmente el exceso se determina por valoración con disolución valorada de base (reacción 4) [45].

a. Digestión



b. Destilación



c. Titulación



3.8. Análisis termogravimétrico

La termogravimetría (TG) o análisis termogravimétrico (TGA; de thermogravimetric analysis) es una técnica de análisis térmico que proporciona una medición cuantitativa de cualquier cambio de peso asociado con transiciones térmicas inducidas; allí, se determina la pérdida o ganancia de masa de una muestra en función de la temperatura. Las curvas termogravimétricas son características de un compuesto o material dado debido a la secuencia única de las transiciones físicas y las reacciones químicas que ocurren sobre intervalos definidos de temperatura. Los cambios de peso resultan de la formación y del rompimiento de los enlaces físicos y químicos a temperaturas elevadas. Estos procesos pueden dar lugar a la formación de productos volátiles o de reacción que conllevan un cambio en el peso de la muestra. Se pueden definir, básicamente tres tipos de análisis termogravimétricos:

1. Análisis termogravimétrico isotérmico, en el que se mantiene la temperatura constante, mientras se registran los cambios de masa.

2. Análisis termogravimétrico cuasi isotérmico, en el que la muestra a analizar se calienta mientras la masa es constante y se estabiliza la temperatura mientras se van produciendo los cambios de masa.
3. Análisis gravimétrico dinámico, en el que la muestra se calienta en una atmósfera controlada con una trampa de temperatura previamente fijada.

Los datos obtenidos por TG son útiles en la caracterización de materiales, suministrando información sobre la estabilidad térmica y descomposición de estos. El intervalo de temperatura usual para la TG va desde temperatura ambiente hasta 1200°C, tanto en atmósfera inerte como reactiva. La representación de la masa en función de la temperatura se denomina termograma o curva de descomposición térmica [46,47].

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

4. ANTECEDENTES

A lo largo de los años se han realizado diversos estudios relacionados con el entrecruzamiento de diversos polímeros y biopolímeros con genipina. A continuación se mencionan algunos de los más resaltantes:

- Santoni y col. [17] caracterizaron hidrogeles de quitosano entrecruzados covalentemente con genipina mediante microscopía electrónica, espectroscopia infrarroja y a través de estudios de reometría dinámica.
- Song y col. [48] formaron hidrogeles de caseína (solución al 8%) con genipina y estudiaron alguna de sus propiedades, tales como la energía de activación, la resistencia mecánica, el hinchamiento y sus propiedades como agente liberador de fármacos, para utilizarlo como agente liberador de proteínas en el intestino.
- Qi y col. [49] realizaron reacciones entre β -lactoglobulina y genipina, con el fin de presentar un estudio detallado de la cinética de reacción, además caracterizaron los compuestos obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), electroforesis y espectrometría de masas.

Por otro lado, se presentan algunas investigaciones relacionadas con la extracción de caseína a partir de la leche y su caracterización:

- Lonergan [50] aisló caseína por ultrafiltración y crio-desestabilización, además caracterizó la composición, la estructura y la funcionalidad de la caseína.
- Vielma y col. [51] aislaron la caseína de la leche bovina mediante precipitación (en su punto isoeléctrico) y realizaron estudios de electroforesis y solubilidad de la proteína.

www.bdigital.ula.ve

5. HIPÓTESIS

Es posible optimizar las condiciones experimentales para obtener un hidrogel químico basado en caseína/genipina que logre combinar grados de hinchamiento adecuados con propiedades físico-mecánicas aceptables para ser usados en estudios de absorción/liberación de sustancias biológicamente activas.

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Obtener hidrogeles a partir de caseína y genipina que combinen preferiblemente altos grados de hinchamiento y propiedades físico-mecánicas para su uso en estudios de hinchamiento y adsorción/liberación de sustancias biológicamente activas.

6.2. Objetivos específicos

- Fijar condiciones adecuadas para la extracción de la caseína a partir de la leche bovina y su posterior caracterización.
- Preparar y caracterizar hidrogeles basados en caseína y genipina.
- Realizar estudios de hinchamiento con los hidrogeles de caseína y genipina.
- En lo posible, realizar estudios de adsorción y/o liberación de sustancias biológicamente activas utilizando los hidrogeles obtenidos.

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

7.1. Materiales y equipos

7.1.1. Materiales

- Leche bovina cruda: obtenida en la empresa universitaria PROGAL, en la comunidad de Santa Rosa, parroquia Milla, municipio Libertador del Estado Mérida-Venezuela el 01 de octubre de 2013.
- Frutos de *Genipa americana L.*: recolectados el 19 de marzo de 2013 en la Parroquia Domingo Ortíz de Páez, sector El Pagüey, municipio Barinas del Estado Barinas-Venezuela.

7.1.2. Reactivos y solventes

En la tabla 4 se muestran los reactivos y solventes empleados en el proceso de extracción y caracterización de la caseína, los cuales fueron utilizados como vienen del proveedor.

Tabla 4: Reactivos y solventes comunes empleados durante el desarrollo del trabajo.

Reactivos y solventes	Pureza	Marca
Hidróxido de sodio	--	IQE
Ácido clorhídrico	37,0	Riedel-de Haen
Lauril sulfato de sodio	99,0	Sigma-Aldrich
Glicina	99,0	Sigma Aldrich
Acrilamida	99,0	Sigma Aldrich
Glicerol	--	Científica Andina
Trizma base	99,9	Sigma Aldrich
2-mercaptoetanol	99,0	Riedel-de Haen
Ácido acético	99,7	Fischer Scientific
N,N'- metilen-bis-acrilamida	99,5	Bioreagent
Metanol	--	IQE
Azul de bomofenol	--	Merck
Azul de coomasie R 250	--	Riedel-de Haen
Persulfato de amonio	98,0	Merck
TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamino)	99,0	Riedel-de Haen
Sulfato de sodio anhidro	--	Científica Andina (de Sigma-Aldrich)
Sulfato de cobre penta hidratado	98,5-101,0	IQE
Ácido sulfúrico	96,0-98,0	LABOQG
Ácido bórico	--	IQE
Patrón de peso molecular	--	BIO-RAD
Genipina	--	Extraída de frutos de <i>G. americana L</i> [52]

7.1.3. Equipos e instrumentos

La tabla 5 muestra los equipos e instrumentos utilizados durante la extracción y caracterización de la caseína, además se indican algunas de sus especificaciones.

Tabla 5: Equipos e instrumentos utilizados.

Equipo o instrumento	Marca	Especificación
Equipo de electroforesis	Bio-Rad. Modelo Mini PROTEAN 3 Cell	Voltaje limite 600 VDC
Balanza analítica	Adventurer OHAUS	Máxima Capacidad: 210 g. Apreciación: 0,0001 g
Centrifuga	Hettich. ROTO Silenta	Máxima Capacidad: 6000 rpm
Estufa	HORO	Capacidad: 200 °C
Lactodensímetro	Quevenne	--
Liofilizador	LABCONCO. FREEZE DRY SYSTEM/FREEZONE 4.5	--
Equipo de FT-IR	Perkin-Elmer RX1, modelo 1605	--
Equipo TGA (Thermal gravimetric analysis)	Perkin Elmer	
Interfase (Thermal analysis controller)	Perkin Elmer TAC 7/DX	
pH meter	Thermo electron corporation ORION 3 STAR	
Conductímetro	HANNA instruments, modelo HI 8033	Capacidad 19990µs
Nevera	Whirlpool	
Ionizador	Engineering IB2 Ion Coater	
Microscopio electrónico	Hitachi S-2500	

7.2. Descripción de las técnicas a utilizar

7.2.1. Obtención de la genipina

La genipina utilizada para la elaboración de los hidrogeles fue extraída según el método que se describe a continuación [52]:

Se seleccionaron frutos verdes de *Genipa americana L.*, luego se les retiró la concha, se pesaron y se separaron en muestras de aproximadamente 100 g, seguidamente se rayaron y colocaron en maceración en 200 mL de cloroformo durante 3 horas a temperatura ambiente y con agitación manual cada 10 min.

El extracto obtenido de la maceración se filtró por gravedad y el solvente fue removido por destilación a presión reducida en un rotaevaporador, allí, se obtiene un aceite de color amarillento al cual se le agregaron unas gotas de acetona para inducir la precipitación de la genipina. Posteriormente, se añadió n-hexano para disolver el aceite remanente y se filtró al vacío, se lavó varias veces con n-hexano.

Finalmente, el producto obtenido fue purificado por recristalización en diclorometano. Al producto recristalizado se le hizo un análisis termogravimétrico. Los termogramas se registraron en un equipo Perkin Elmer con un controlador Perkin Elmer TAC 7/DX, perteneciente al laboratorio de Polímeros de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes.

7.2.2. Extracción de la caseína

Descremado de la leche: inicialmente se tomó un litro de leche cruda y se descremó por centrifugación a 4000 rpm a 25 °C durante 10 min. Se colocaron cantidades pequeñas de leche a

centrifugar en tubos de 50 mL y se eliminó la grasa que quedó en la superficie de cada uno de ellos, el proceso se realizó por triplicado.

Determinación de la densidad de la leche descremada: en un cilindro graduado se agregaron 250 mL de leche descremada, luego se introdujo un lactodensímetro, se dejó estabilizar y se tomó la medida (figura 5a y 5b).

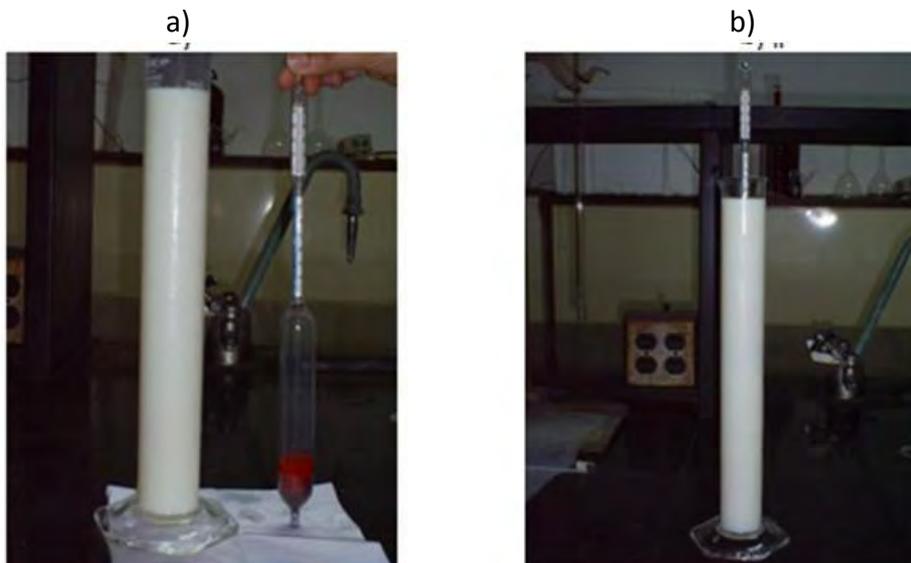


Fig. 5: a) Cilindro graduado con leche descremada (izquierda) y lactodensímetro (derecha). b) Determinación de la densidad.

Precipitación de la caseína: a la muestra de leche remanente del descremado se le agregó 400 mL de agua destilada; posteriormente, se realizó la precipitación de la caseína llevando la solución a pH 4,60 con ácido clorhídrico y agitación constante. Una vez precipitada la caseína, se filtró por gravedad utilizando un trozo de tela. El precipitado se lavó varias veces con agua destilada; el producto obtenido fue solubilizado llevándolo a pH 7 con hidróxido de sodio y nuevamente precipitado a pH 4,60. El proceso realizó 4 veces y luego se filtró por gravedad y el residuo se liofilizó. La muestra se guardó en la nevera a 4 °C, aproximadamente (figura 6a y 6b).



Fig. 6: a) Sistema utilizado para la extracción de la caseína. b) Eliminación del sobrenadante, luego de la precipitación.

Liofilización de la caseína: las muestras se congelaron con nitrógeno líquido, inmediatamente se colocaron durante 6 horas en un liofilizador FREEZE DRY SYSTEM/FREEZONE 4.5 LABCONCO, perteneciente al laboratorio de biotecnología de microorganismos "SIXTO DAVID ROJO" de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes.

7.2.3. Caracterización de la caseína

Determinación del contenido proteico (método de Kjeldahl): la determinación del contenido proteico se realizó por el método de Kjeldahl micro-manual, siguiendo la metodología de la AOAC con algunas modificaciones [53]:

a) Digestión: se pesó aproximadamente 0,1 g de muestra y se transfirió a balones micro Kjeldahl de 30 mL de capacidad. Se agregó aproximadamente 1 g de sulfato de sodio, 0,01 g de sulfato de cobre pentahidratado y 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente las muestras se colocaron en un digestor y se calentaron hasta que el digerido tomo una coloración verde pálido (figura 7a y 7b).

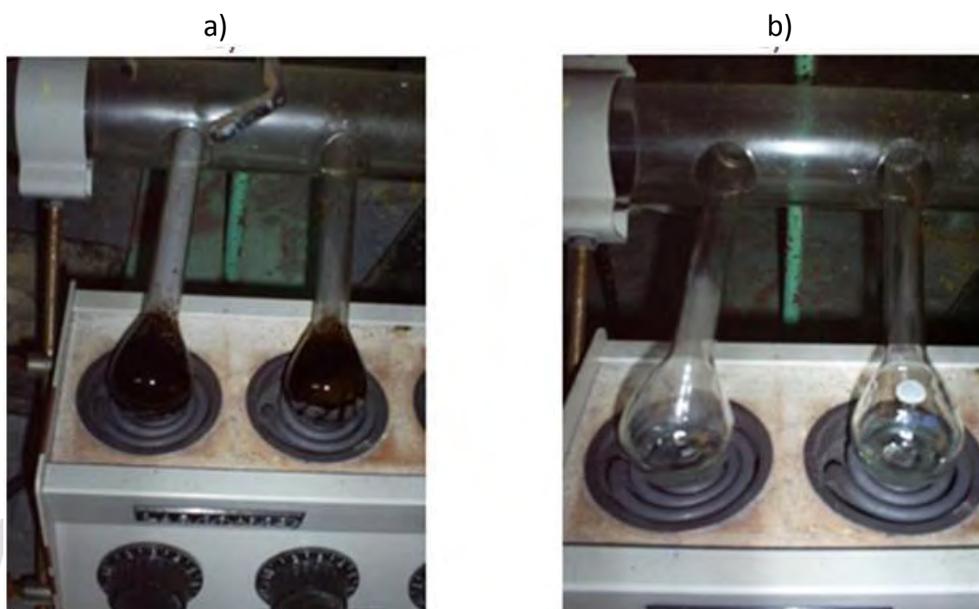


Fig. 7: a) Inicio de la digestión b) final de la digestión.

b) Destilación: en un erlenmeyer se añadieron 5 mL de solución de ácido bórico al 4 % y 3 gotas de indicador de Toshiro (2 partes de rojo de metilo al 0,2 % y 1 parte de azul de metileno al 0,2 %, ambas soluciones alcohólicas) y se colocó éste a la salida del destilador, de modo que la punta del refrigerante quedara sumergida sobre la solución. Posteriormente, el digerido de la parte anterior se disolvió en 5 mL de agua destilada y se transfirió a la cámara interna de destilación (se realizaron lavados sucesivos a los balones con porciones de 2 mL de agua destilada), luego se añadieron 8 mL de solución de $\text{NaOH-Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (60 g de NaOH y 5 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/100$ mL); finalmente, se cerraron las llaves del equipo y se encendió el generador de vapor hasta recoger 50 mL de destilado.

c) Titulación: el destilado obtenido en la parte anterior se tituló con HCl 0,02 N previamente estandarizado con Na_2CO_3 (patrón primario para ácidos) [54].

Electroforesis en geles de poliacrilamida: se prepararon muestras de 0,25 % y 0,5 % de caseína, se midieron 50 μL de éstas y se transfirieron a un tubo Eppendorf junto con 25 μL de buffer de muestra (tabla 6) y 5 μL de azul de bromofenol; los tubos se taparon y se colocaron en baño de María a 100 °C durante 5 min (figura. 8).



Fig. 8: Preparación de las muestras para electroforesis.

Las muestras preparadas en el paso anterior fueron inyectadas en los pozos formados en los geles de poliacrilamida al 15%, donde se realizó la separación de la caseína (ver tabla 7).

Tabla 6: Soluciones estándar utilizadas en electroforesis [55].

Solución	Preparación
Buffer Lower (pH 8,8)	Disolver 18,2 g de tris - base y 0,4 g de SDS en 100 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8,8 con HCl. Almacenar a 4 °C.
Buffer Upper (pH 6,8)	Disolver 6,055 g de tris – base y 0,4 g de SDS en 100 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 6,8 con HCl. Almacenar a 4 °C.
Buffer de muestra (pH 6,8)	Disolver 0,3 g de tris – base y 0,8 g de SDS en 20 mL de agua destilada, añadir 4 mL de glicerol 0,281 mL de β -mercaptoetanol y azul de bromofenol (de manera arbitraria) y completar con agua destilada hasta 40 mL.
Acrilamida 30%	Disolver 58,42 g de acrilamida y 1,59 g de N,N'-metilen bis-acrilamida en 200 mL de agua destilada. Filtrar en papel Whatman y almacenar a 4 °C.
Buffer de corrida (pH 8,3)	Disolver 3,03 g de tris – base, 14,26 g de glicina y 1 g de SDS en 1000 mL de agua destilada. Almacenar a 4 °C.
Solución colorante	Disolver 0,416 g de azul de coomasie R 250 en 151,33 mL de metanol 50 %, luego añadir 15,33 mL de ácido acético glacial.
Solución decolorante	Mezclar 75 mL de ácido acético glacial, 250 mL de metanol y 675 mL de agua destilada.

Tabla 7: Preparación de geles de electroforesis SDS-PAGE (15%) [55].

Solución	Preparación
Gel de separación	Mezclar 2,3 mL de agua destilada; 2,5 mL de buffer Lower, 5 mL de solución de acrilamida 30 %; 0,1 mL de solución de SDS 10%, 2 mg de PSA y 10 μ L de TEMED.
Gel de pre-concentración	Mezclar 3,4 mL de agua destilada; 0,63 mL de buffer Upper (pH 8,8); 0,83 mL de solución de acrilamida 30 %; 0,05 mL de solución de SDS 10 % ,2 mg de PSA y 5 μ L de TEMED.

Espectroscopia IR: las muestras se prepararon como pastillas de KBr; se utilizó un espectrofotómetro infrarrojo-FT Perkin-Elmer RX1, modelo 1605, perteneciente al Laboratorio de Docencia de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes.

Análisis termogravimétrico: los termogramas se registraron en el equipo descrito anteriormente, usando 8 mg de muestra, el proceso se llevó a cabo aumentando la temperatura desde 25 hasta 500 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, en atmósfera de nitrógeno a un flujo constante de 50 mL/min; los datos de las curvas DTG fueron procesadas por el programa Start Pyris 9.1.

7.2.4. Preparación de hidrogeles de caseína/genipina

Elaboración de hidrogeles en forma de discos: se prepararon soluciones de caseína al 8 % (p/v) en agua destilada, se llevaron a pH ~9 con NaOH 5 M y se dividieron en 5 tubos de centrifuga. Por otro lado, se prepararon 10 mL de solución de genipina 1,6 % y se agregaron distintas cantidades de ésta a los tubos que contenían la caseína para tener diferentes concentraciones en volúmenes idénticos (ver tabla 8). Se tapó y mezcló la solución de cada tubo y se dejó reaccionar durante 72 horas.

Tabla 8: Cantidades utilizadas para la preparación de hidrogeles en forma de discos.

N° Tubo	m _{Cas} (g)	m _{Gen} (g)	%Gen (p/p)	V _{Gen} (mL)	V _{agua} (mL)
1	0,04002	0,0040	1	0,25	4,75
2	0,04000	0,0080	2	0,50	4,50
3	0,04009	0,0160	4	1,00	4,00
4	0,04009	0,0240	6	1,50	3,50
5	0,04004	0,0320	8	2,00	3,00

Elaboración de hidrogeles en forma de esferas: de manera resumida el procedimiento seguido fue el siguiente:

- Se preparó una solución de caseína al 13 % (p/v), llevando el pH de la solución resultante a un valor alrededor de 9 con NaOH 2M.
- Se usó la solución anterior para preparar dos muestras con grados de entrecruzamiento distintos, agregándole la cantidad adecuada de una solución de genipina para obtener mezclas con concentraciones de 4 y 6 % (p/p) con respecto a la caseína.
- Se formaron esferas dejando caer gotas de la muestra anterior en 100 mL de HCl 10 % (p/v). Las esferitas obtenidas se trasvasaron a un recipiente con 100 mL de etanol 98 % y se mantuvieron en el refrigerador hasta completar las 72 horas de reacción; las muestras resultantes se codificaron como CAS13/GEN4 y CAS13/GEN6, respectivamente (Fig. 9).
- Se dializaron porciones de esferitas de CAS13/GEN4 y CAS13/GEN6 contra agua destilada hasta que el valor de la solución externa alcanzó valores similares a los del agua destilada usada para la diálisis. Las muestras así obtenidas fueron codificadas como CAS13/GEN4-D y CAS13/GEN6-D, respectivamente.



Fig. 9: Elaboración de los hidrogeles en forma de esferas a partir de las mezclas de caseína/genipina estudiadas.

7.2.5. Caracterización de los hidrogeles de caseína/genipina

Análisis termogravimétricos (TGA y DTG): las muestras se prepararon pesando alrededor de 20 mg de hidrogel en la termobalanza del equipo. El proceso se llevó a cabo de la misma manera que en el caso de la genipina y caseína.

Microscopía electrónica de barrido: las muestras se colocaron en un ionizador durante 5 minutos en atmósfera de helio a una corriente de 7 mA, luego se colocaron en el microscopio electrónico para realizar la observación.

7.2.6. Estudios de hinchamiento de los hidrogeles

Se realizaron midiendo gravimétricamente la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles en medios acuosos a diferentes pH (2-12) (ver tabla 13-56). El proceso se llevó a cabo, colocando los hidrogeles en forma de esferitas en 100 mL del medio de hinchamiento y pesando a determinados tiempos durante aproximadamente 4 días. El valor del porcentaje de sólido en los hidrogeles hinchados ($m_s \times 100 / m_h$) se determinó midiendo la diferencia de peso entre las muestras equilibradas en agua (m_h) y el valor promedio de masa seca (m_s) obtenido para 8 esferitas, las cuales se dejaron secar hasta peso constante en una estufa a 50 °C durante 4 días; igualmente se pudo obtener un valor para este parámetro del estudio de TGA de la muestra estudiada termogravimétricamente.

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Obtención y caracterización de la genipina

Con el fin de asegurar la identidad de la genipina utilizada se realizó la caracterización de ésta. En primer lugar se determinó su punto de fusión, el cual dio como resultado un intervalo entre 117,5-118,3 °C, resultando menor al valor reportado (120-121 °C) [56]. Por ello, se realizó un análisis espectroscópico de infrarrojo con el propósito de verificar la presencia de los principales grupos funcionales de la genipina. La tabla 9 muestra algunos modos vibracionales obtenidos del espectro de IRFT (figura 10) y las asignaciones correspondientes a cada uno de ellos. Se pueden observar bandas para enlaces de tipo O-H, C=O, C=C, y C-O (éster), las cuales corresponden a la molécula de genipina y son idénticas a las señales reportadas por otros autores [57].

De acuerdo con los resultados del estudio de IRFT, la pequeña diferencia observada entre los puntos de fusión puede ser debida a la existencia de los polimorfos conformacionales en la muestra de genipina obtenida, como ha sido reportado por Trevor *et al.* [58].

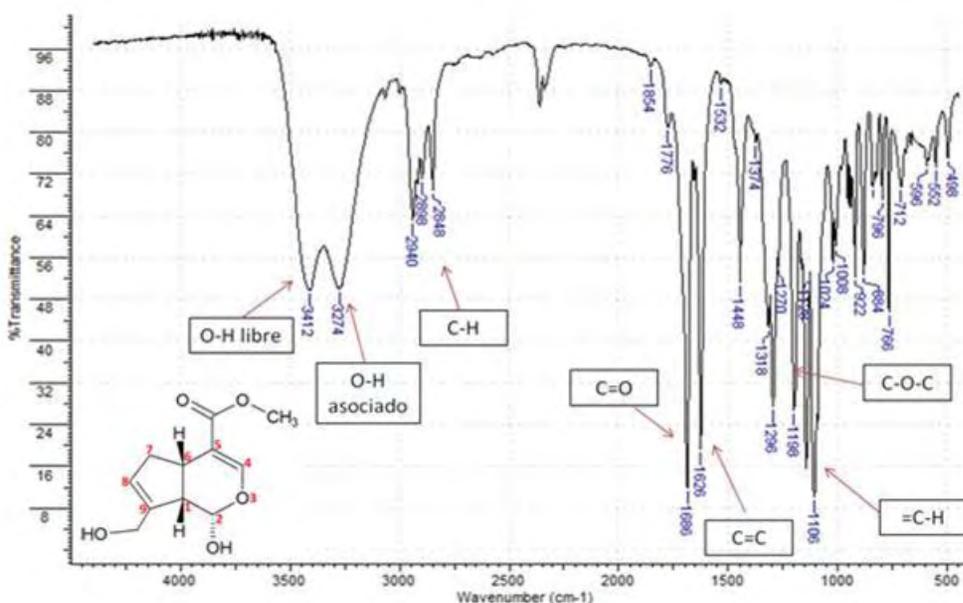


Fig. 10: Espectro de IRFT obtenido para la genipina utilizada. Tomado como pastilla de KBr.

Tabla 9: Asignación de las señales en el espectro de IRFT de la genipina utilizada.

Grupo	Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación
O-H	3412	Vibración de tensión O-H libre
O-H	3274	Vibración de tensión O-H asociado
Csp ₂ -H	2940	Vibración tensión asimétrica C-H alqueno
Csp ₃ -H	2898	Vibración de deformación asimétrica C-H metileno
Csp ₃ -H	2848	Vibración de deformación simétrica C-H metileno
C=O	1686	Vibración de tensión C=O
C=C	1626	Vibración de tensión C-C alqueno
Csp ₃ -H	1448	Vibración de deformación asimétrica C-H metilo
Csp ₂ -H	1318	Vibración de deformación del aleteo C-H (carbono 8)
O-H	1296	Vibración de deformación O-H en el plano
C-O	1198	Vibración de tensión C-O éster
Csp ₂ -H	1106	Vibración de deformación C-H fuera del plano (ciclo alqueno)

Por otro lado, se realizó un análisis termogravimétrico de la genipina con el fin de estudiar su estabilidad térmica. La figura 11 muestra el termograma (TGA y DTGA) obtenido, donde se puede observar que la pérdida de masa ocurre en dos etapas:

- Una etapa inicial más rápida entre 150-250 °C, con su máxima velocidad alrededor de 210 °C, lo cual coincide con el valor reportado por Di Tomasso (205 °C) para la descomposición térmica de la genipina [59].
- Una etapa final más lenta, que deja al final (430 °C) un residuo de ~38 %.

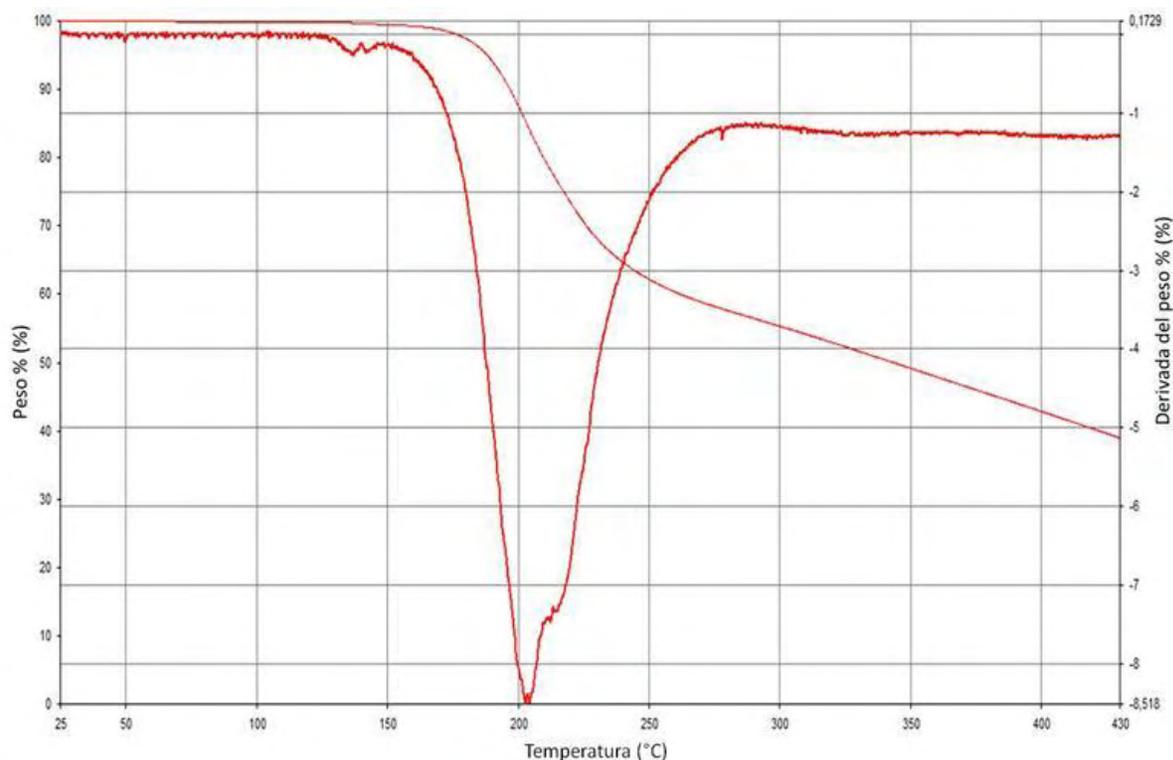


Fig. 11: Trazas de TGA y DTGA obtenidas para la genipina utilizada. Velocidad de barrido 10 oC/min. bajo flujo de nitrógeno (50 mL/min.)

8.2. Extracción y caracterización de la caseína

La determinación de la densidad de la leche descremada, utilizando el lactodensímetro de n.Quevenne, arrojó un valor de $1,035 \pm 0,001$ g/mL, el cual es similar al reportado en diversas fuentes [60].

Por su parte, la tabla 10 muestra los resultados obtenidos durante la extracción de la caseína, partiendo de 1 litro de leche descremada en cada una de las experiencias y siguiendo el método de precipitación en su punto isoelectrico antes descrito. Se pueden observar diferencias muy significativas para los valores obtenidos en las tres muestras ensayadas, las cuales pudieran ser atribuidas a la incertidumbre que se puede generar en algunos de los procesos manuales realizados, como por ejemplo el proceso de descremado de la leche o en el proceso de precipitación de la caseína; en el caso del descremado, la eliminación del contenido graso se hizo mediante decantación manual, no habiéndose cuantificado la cantidad de grasa extraída en cada experiencia, por lo que no se tiene evidencia de que haya sido la misma en todos los casos. Igualmente, en el proceso de precipitación de la caseína, el precipitado resultante puede contener cantidades distintas de agua.

Tabla 10: Resultados obtenidos durante la extracción de la caseína.

Muestra	pH _L inic	m _{inic} Leche (g)	m _{Cas} húmeda (g)	m _{Cas} liofiliz (g)	% caseína (liofilizada)	pH de precipitación
M1	6,70	1.035	57,1124	22,0718 (61 %)*	2,1325	4,60
M2	6,72	1.035	22,3562	9,0412 (60 %)*	0,8735	4,60
M3	6,69	1.035	37,8525	8,9556 (76 %)*	0,8653	4,60
Promedio	---	1.035	39 ± 17	13 ± 8	1,30 ± 0,7	---

* % de agua en la caseína precipitada

Por otro lado, la tabla 11 muestra los porcentajes de nitrógeno (%N), determinados por el método de Kjeldahl micro-manual, calculados mediante la ecuación (4), y los porcentajes de proteína (%P) calculados según la ecuación (5).

$$\%N = \frac{V \times N \times M}{10 \times a} \quad (4)$$

donde V = volumen de HCl gastado en la titulación (mL)

N = normalidad del HCl

M = masa molar del nitrógeno

a = masa de muestra utilizada (g)

$$\%P = \%N \times 6,38 \quad (5)$$

Tabla 11: Determinación del porcentaje de nitrógeno y de proteína por el método de Kjeldahl micro-manual.

Muestra	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Promedio ± DE	% Error	
%N	M1	14,99±0,01	14,93±0,01	14,54±0,01	14,8 ± 0,3	1,65
	M2	12,81±0,01	12,72±0,01	12,81±0,01	12,8 ± 0,1	0,41
	M3	15,18±0,01	14,44±0,01	14,46±0,02	14,7 ± 0,4	2,87
Promedio ± DE	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	--	1,64	
%P	M1	95,64±0,06	95,25±0,06	92,77±0,06	95 ± 2	1,64
	M2	81,73±0,06	81,15±0,06	81,73±0,06	81,5 ± 0,3	0,40
	M3	96,85±0,06	92,13±0,06	92,25±0,06	94 ± 3	2,86
Promedio ± DE	91 ± 8	90 ± 7	89 ± 6	--	1,63	

Los porcentajes obtenidos para el %P se pueden considerar aceptables cuando se comparan con reportes de otros autores, habiéndose incluso reportado valores de hasta 78 % de proteína en algunas muestras de caseína [61]; sin embargo, éste porcentaje puede variar de acuerdo a la leche utilizada y a la pureza de la caseína obtenida.

Para determinar si la caseína contiene trazas de otras proteínas de la leche y para estimar su peso molecular se realizó un análisis electroforético. En el análisis electroforético (figura 12), se distinguieron aproximadamente seis bandas de proteínas. Para estimar sus masas molares aproximadas, éstas fueron comparadas con las bandas de los patrones de peso molecular (escalera de pesos moleculares). Se observó que en el rango de 55.800-100.000 Dalton se obtuvieron dos bandas con muy baja intensidad, las cuales coinciden con las de seroalbúmina [62]. En la zona intermedia entre 20.000-30.000 Dalton, se apreciaron tres bandas de proteínas correspondientes a los diferentes tipos de caseínas. Finalmente en la región entre 15.000-20.000 Dalton se observaron dos bandas de baja intensidad que se corresponden con las de lactoglobulinas [62]. Las asignaciones de las bandas se realizaron a partir de los reportes realizados por diversos autores [63].

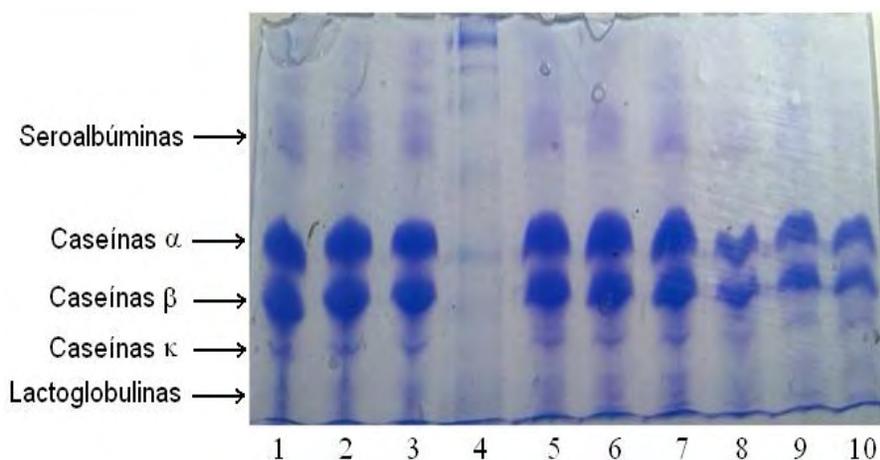


Fig. 12: Gel de electroforesis SDS-PAGE de la Caseína: 1) Caseína 1 (0,5 %; 10 μ L). 2) Caseína 2 (0,5 %; 10 μ L). 3) Caseína 3 (0,5 %; 10 μ L). 4) Patrones de peso molecular. 5) Caseína 1 (0,25 %; 10 μ L). 6) Caseína 2 (0,25 %; 10 μ L). 7) Caseína 3 (0,25 %; 10 μ L). 8) Caseína 1 (0,1 %; 25 μ L). 9) Caseína 2 (0,1 %; 25 μ L). 10) Caseína 3 (0,1 %; 25 μ L).

Tabla 12: Valores de Rf de proteínas de patrón de peso molecular en gel de electroforesis SDS-PAGE (figura 12, pozo 4).

Peso molecular (Daltons)	Rf
195.414	0,101
102.493	0,188
55.846	0,275
41.076	0,358
27.648	0,588
20.624	0,675
15.050	0,825
6.408	0,945

La figura 13 representa la curva de calibración del estándar del peso molecular, de acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 12. Los valores de Rf de las proteínas en estudio son derivados del gel de electroforesis (figura 12, pozo 4).

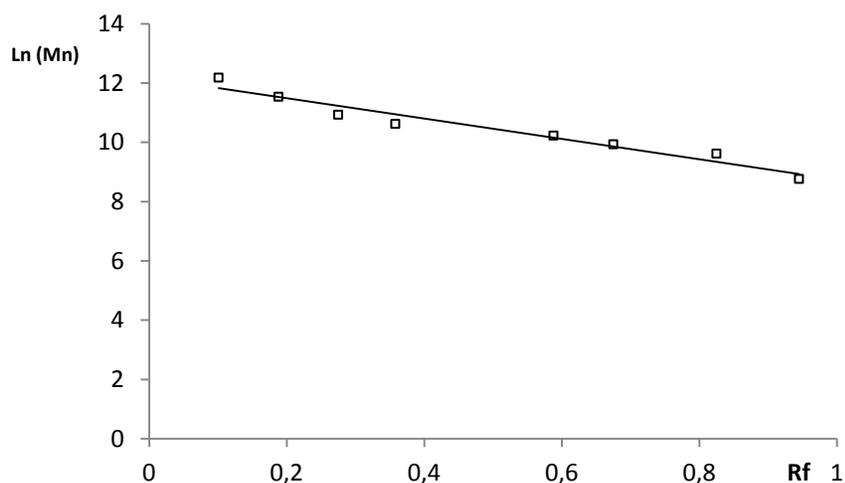


Fig. 13: Curva de calibración de proteínas estándar en gel de electroforesis SDS-PAGE.

En cuanto a la caracterización de la caseína por IRFT, se observó gran similitud entre las tres caseínas extraídas. La tabla 13 muestra las asignaciones y las posiciones de cada banda representada en los espectros IR. El espectro IR de una proteína (figura 14), presenta bandas características denominadas amidas, que son debidas a las vibraciones de los átomos involucrados en el enlace peptídico.

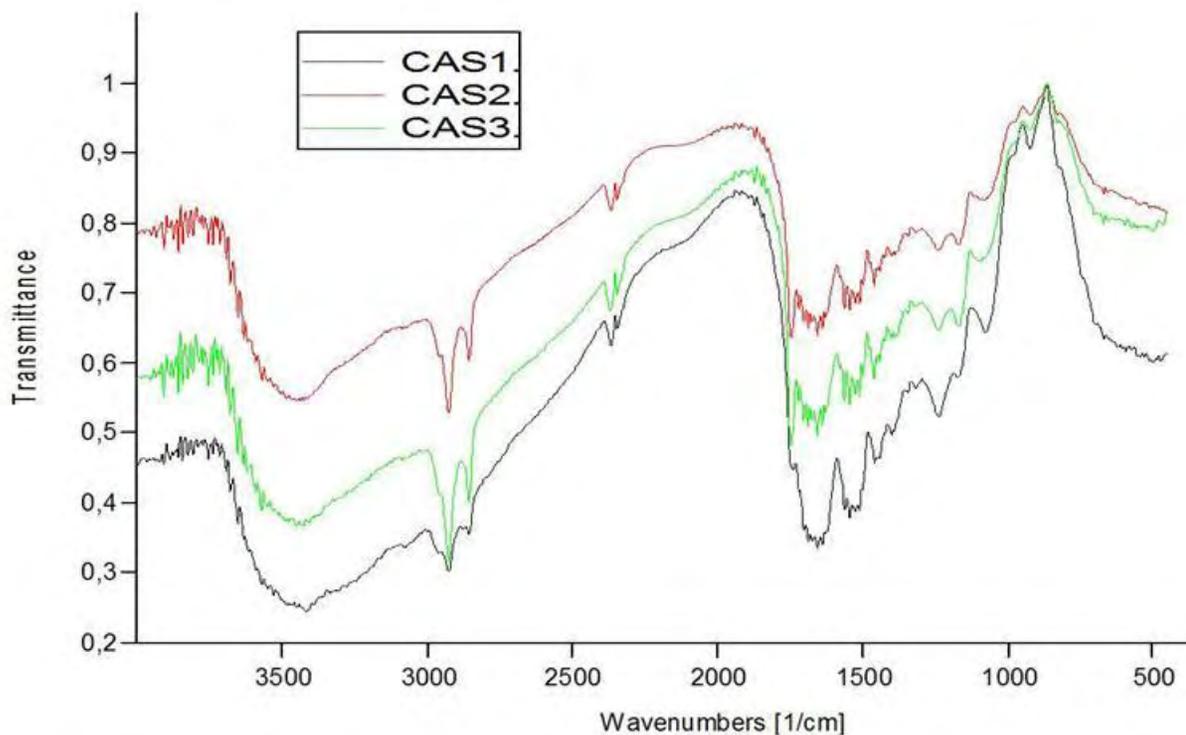


Fig. 14: Espectros IR de las muestras de caseína obtenidas.

Tabla 13: Asignación de las señales en el espectro de IRTF de la caseína extraída.

Grupo	Caseína 1 (cm ⁻¹)	Caseína 2 (cm ⁻¹)	Caseína 3 (cm ⁻¹)	Asignación
N-H	3414	3446	3448	Vibración de tensión N-H (amida A)
Csp ₃ -H	2924	2924	2924	Vibración de tensión C-H
C=O	1745 (hombro)	1745	1745	Vibración de tensión C=O carboxilo
C=O	1654	1654	1655	Vibración de tensión C=O (amida I)
N-H	1542	1542	1543	Vibración de flexión N-H (amida II)
C=N	1457	1457	1458	Vibración de tensión C=N

Los espectros de IRFT para las tres caseínas extraídas presentan gran similitud, a excepción de la banda a 1.745 cm⁻¹ que en la caseína 1 no se observa tan pronunciada sino como un pequeño hombro. Igualmente, la caseína 1 presenta una relación de la intensidad de las señales en 1.232 y 1.140 cm⁻¹ distinta.

Para profundizar en la caracterización de la caseína obtenida se realizó un análisis termogravimétrico a fin de comparar su comportamiento con el reportado para otras muestras de caseína. En la figura 15 se pueden observar las dos principales etapas de pérdida de peso que se registraron durante todo el proceso:

- La primera de ellas se desarrolló entre 25-125 °C, arrojando una pérdida de peso de 9,4 % con respecto al peso total de la muestra; ésta se atribuye a la deshidratación de la muestra.
- El material permanece estable hasta alrededor de 200 °C, donde comienza la segunda etapa de pérdida de masa, asignada en este caso a la ocurrencia de procesos de degradación térmica de la caseína y generando una pérdida de masa de ~55 % entre 200-430 °C. Al final del estudio (430 °C) se obtiene un residuo del 34,6 %, un valor que representa el 38,4 % de la matriz de caseína (luego de la pérdida de agua en la primera etapa).

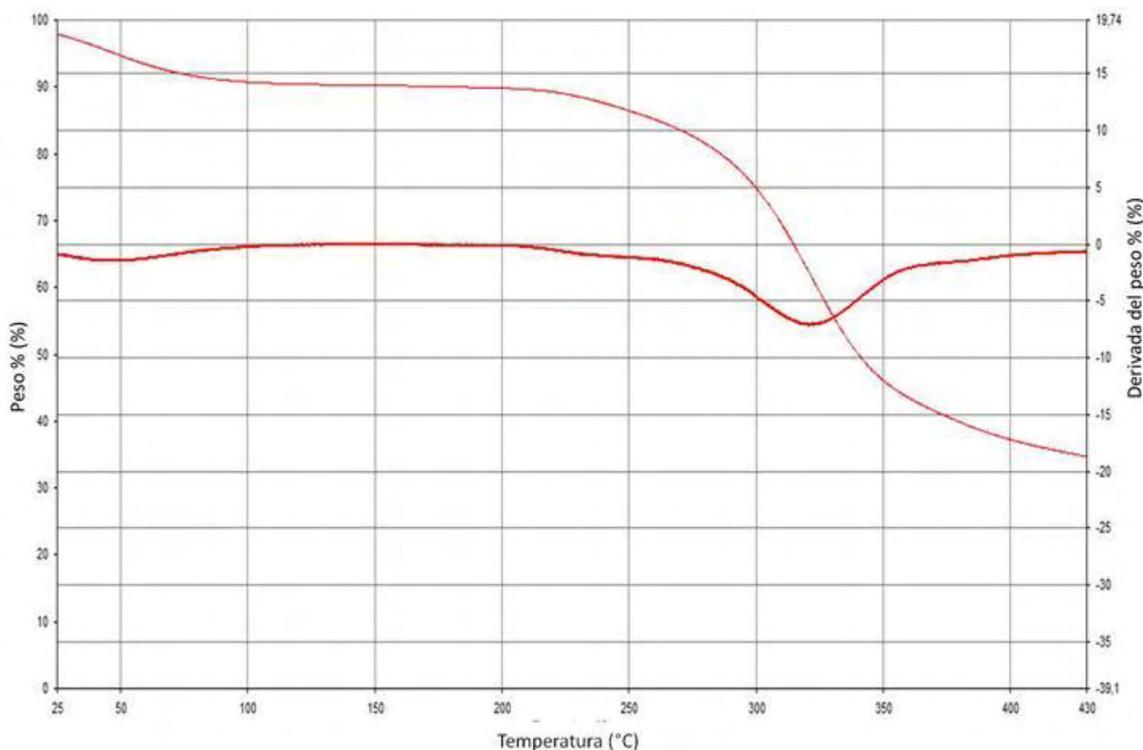


Fig. 15: Trazas de TGA y DTGA para la caseína extraída (Caseína 2). Velocidad de barrido 10 oC/min. bajo flujo de nitrógeno (50 mL/min.)

En estudios previos realizados por otros autores sobre la degradación térmica de la caseína, usando TGA, se reportó que el proceso global ocurre con pérdida de peso en cuatro etapas [64], siendo las dos primeras etapas muy similares a las obtenidas en este trabajo y ocurriendo en el mismo intervalo de temperatura; sin embargo, la relación “residuo final (a 430 °C)/masa remanente de caseína” resultó algo superior (~52) aunque esta diferencia puede ser debida a que dicho estudio se realizó en atmósfera de aire. Las otras dos etapas reportadas no pudieron ser comparadas pues se observaron a temperaturas mayores de 430 °C. De acuerdo con estos investigadores, luego de la pérdida inicial del agua ocurre subsecuentemente la ruptura de los extremos de las cadenas debido a que en la segunda etapa se observó desprendimiento de CO₂ y NH₃ en el análisis por IRFT; el desprendimiento subsecuente de H₂O, HNCO y CO implica la ruptura de los enlaces internos.

8.3. Preparación de hidrogeles de caseína/genipina

Como se mencionó en la parte experimental, los estudios de los hidrogeles se realizaron con muestras preparadas de dos formas distintas: discos y esferas. Los hidrogeles en forma de disco se prepararon en envases cilíndricos a fin de poder cortarlos posteriormente en forma de discos; sin embargo, no

presentaron buenas propiedades mecánicas al final del desarrollo de la reacción de entrecruzamiento. Adicionalmente, los hidrogeles se fueron descomponiendo aún dentro del refrigerador, adquiriendo mal olor y una apariencia desagradable. No obstante, con estas experiencias se pudieron estimar algunos parámetros importantes de la reacción, como el tiempo de entrecruzamiento, los cambios de coloración (figura 16) y de viscosidad durante el proceso de reticulación, los cuales mostraron que efectivamente la genipina puede entrecruzar la caseína en un tiempo de alrededor de 72 horas. De estos resultados también resultó claro que para lograr hidrogeles con mayor firmeza se debería usar una solución de caseína de mayor concentración.

Por otro lado, y luego de algunos ensayos preliminares, se estableció que las esferas logran formarse satisfactoriamente usando una solución 13 % (p/v) de caseína, aún aquellas que no contenían genipina. Al inicio de la reacción, antes de la formación de las esferas, se observó un cambio de coloración en la mezcla caseína/genipina, pasando del amarillo a naranja (figura 17); posteriormente, durante la formación de las esferitas en la solución de HCl, la coloración cambió nuevamente a amarillo claro (figura 18) y, finalmente, después que culmina la reacción, el color de los hidrogeles fue azul intenso (figura 19).



Fig. 16: Cambios de coloración observados durante la reacción de entrecruzamiento de los hidrogeles de caseína/genipina con diferentes concentraciones de genipina: a) CAS13/GEN1,5; b) CAS13/GEN3; c) CAS13/GEN4; d) CAS13/GEN6.



Fig. 17: Fotografías que muestra los distintos colores de los estadios alcanzado durante la reacción antes de la formación de esferas de caseína/genipina.



Fig. 18: Formación de esferas dejando caer las gotas de la mezcla de caseína/genipina en HCl concentrado.

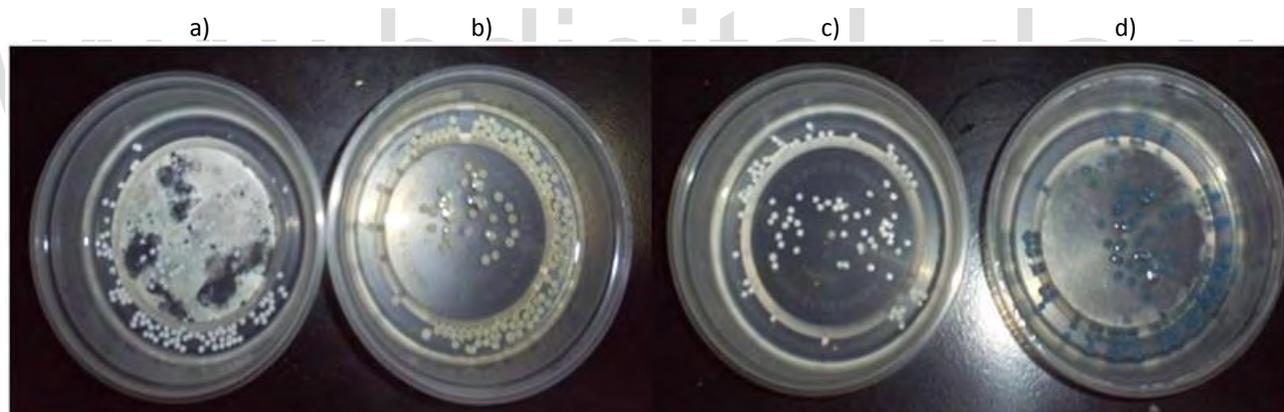


Fig. 19: Esferas de caseína al inicio y al final de la reacción (a y c), respectivamente y de CAS13/GEN6 (b y d), respectivamente al inicio y al final de la reacción

El proceso también se realizó con una solución de caseína sin añadir el agente entrecruzante; en ese caso se observó la formación de las esferas pero no se observó ningún cambio de coloración, lo que constituye un indicio del entrecruzamiento en el caso de los hidrogeles de caseína/genipina. Es destacable también que las esferas formadas solo con caseína presentaron una consistencia más blanda al tacto que las esferas formadas con las mezclas de caseína/genipina.

8.4. Caracterización de los hidrogeles de caseína/genipina

Estudio termogravimétrico de los hidrogeles de caseína/genipina

Se realizó el estudio de TGA de las esferas CAS13/GEN6 y CAS13/GEN6-D con el fin de observar posibles variaciones en su comportamiento. Igualmente se realizó el estudio para una muestra de

las esferas procedentes de CAS13/GEN6 luego de que ésta alcanzase su hinchamiento de equilibrio en una solución acuosa con un valor de pH inicial de 12, valor que se mantuvo durante todo el proceso de hinchamiento.

La figura 20 muestra el termograma de una esfera del hidrogel de CAS13/GEN6-D. En este caso se puede apreciar que hay dos etapas en el proceso de pérdida de masa sufrido por la muestra:

- la primera, con una pérdida de masa de aproximadamente el 88,5 % entre 25-210 °C, atribuida a la pérdida de agua,
- y la segunda, entre 280-370 °C, propia de la descomposición térmica de la matriz de caseína en el hidrogel, que deja un residuo de 5,1 %; este último valor representa el 44,1 % de la matriz de hidrogel sin considerar el solvente perdido. Es importante mencionar, que este valor es algo superior al de la caseína sola debido a que el proceso se realizó solo hasta 370 °C por problemas de saltos de la muestra durante el barrido térmico. Sin embargo, esta etapa luce cualitativamente similar a la mostrada durante la descomposición térmica de la caseína sola (figura 15).

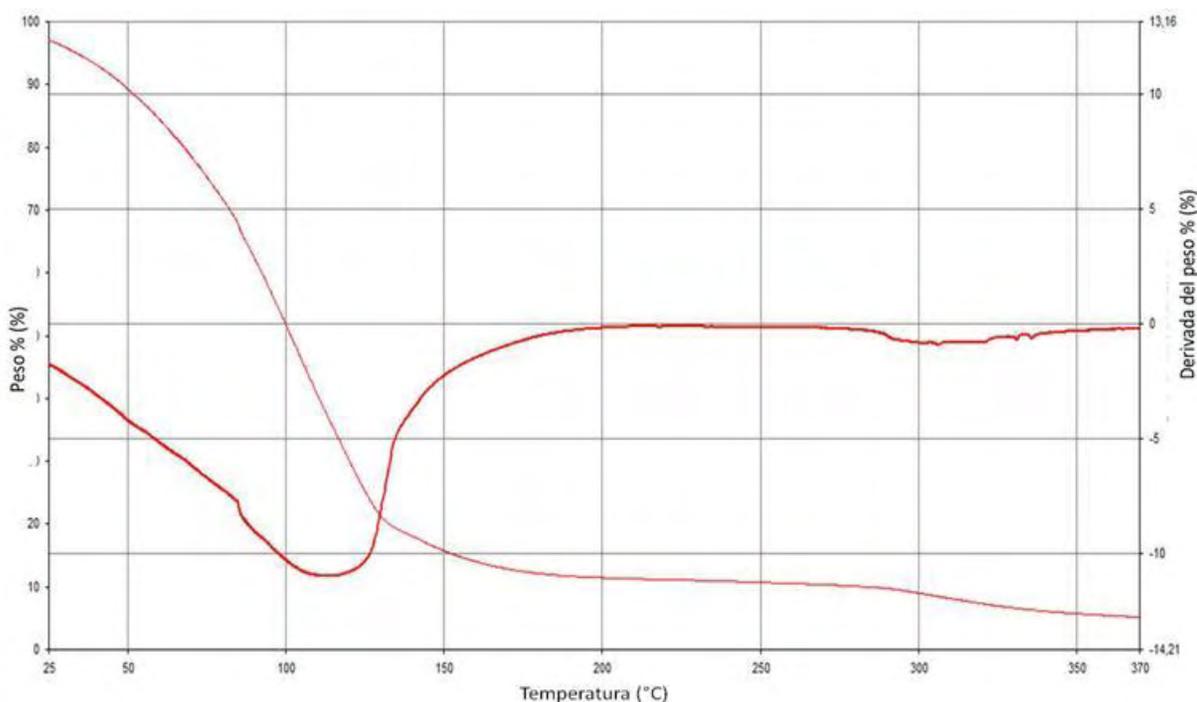


Fig. 20: Traza de TGA del hidrogel de CAS13/GEN6-D. Velocidad de barrido 10 °C/min. bajo flujo de nitrógeno (50 mL/min.)

Por otro lado, la figura 21 muestra el termograma obtenido en el estudio de una esferita del hidrogel CAS13/GEN6 conservado en alcohol. En este caso también se aprecia que el proceso ocurre en dos etapas:

- la primera, con una pérdida de masa de 84,5% entre 25-200 °C, atribuida a la pérdida del etanol,
- y la segunda entre 250-430 °C, atribuida a la descomposición térmica de la matriz de caseína en el hidrogel, dejando un residuo de 5,48%, el cual representa el 35,4 % de la matriz de hidrogel (sin considerar el etanol ya perdido).

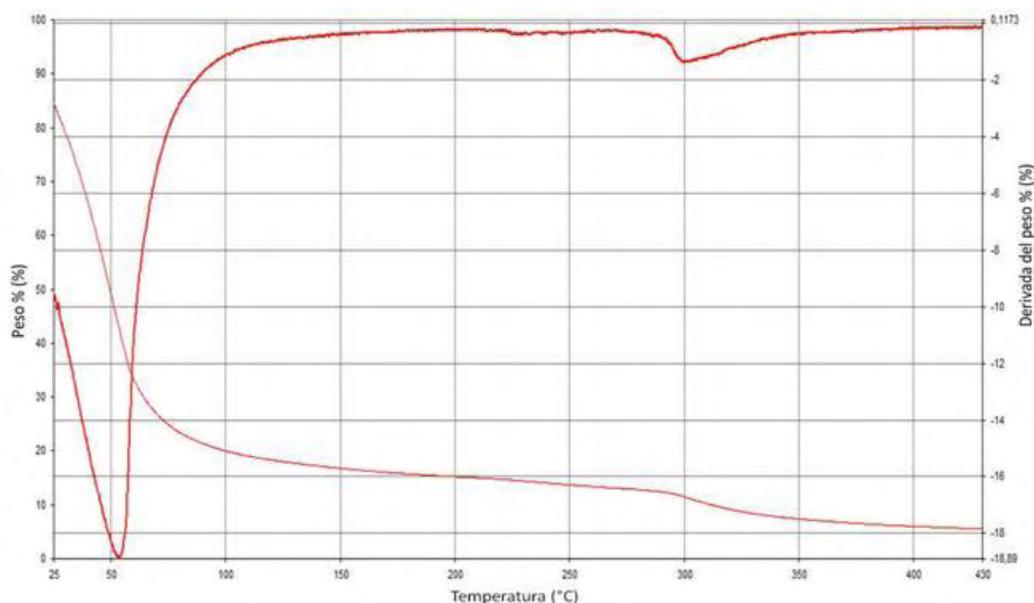


Fig. 21: Traza de TGA para el hidrogel de CAS13/GEN6 conservado en alcohol. Velocidad de barrido 10 °C/min. bajo flujo de nitrógeno (50 mL/min.)

Similarmente, la figura 22 muestra el termograma del hidrogel de CAS13/GEN6-D después de alcanzar su equilibrio de hinchamiento en medio acuoso a pH 12. En este caso, los resultados también indican que el proceso ocurre en dos etapas:

- la primera, con una pérdida de masa de 96,7 % entre 25-170 °C, atribuida a la deshidratación del hidrogel,
- y la segunda entre 240-430 °C, que deja un residuo final de 1,36 %, debida a la descomposición de la matriz del hidrogel; este valor representa el 41,2 % de la matriz de hidrogel (luego de perder el solvente).

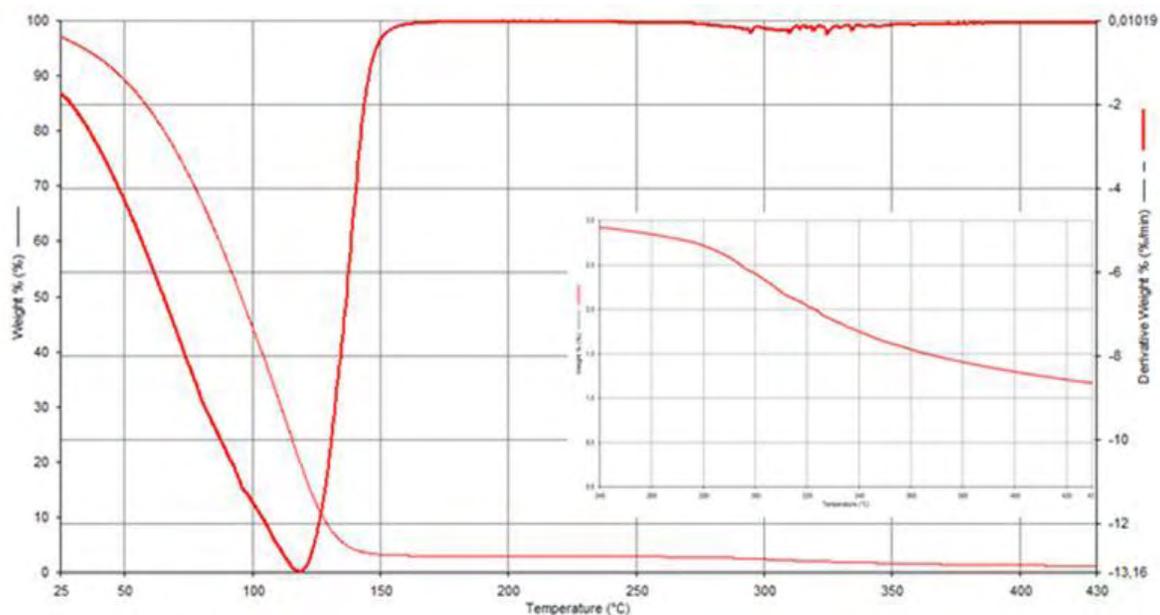


Fig. 22: Traza de TGA del hidrogel de CAS13/GEN6-D luego de alcanzar su hinchamiento de equilibrio en medio acuoso a pH 12. Velocidad de barrido 10 °C/min. Bajo flujo de nitrógeno (50 mL/min.)

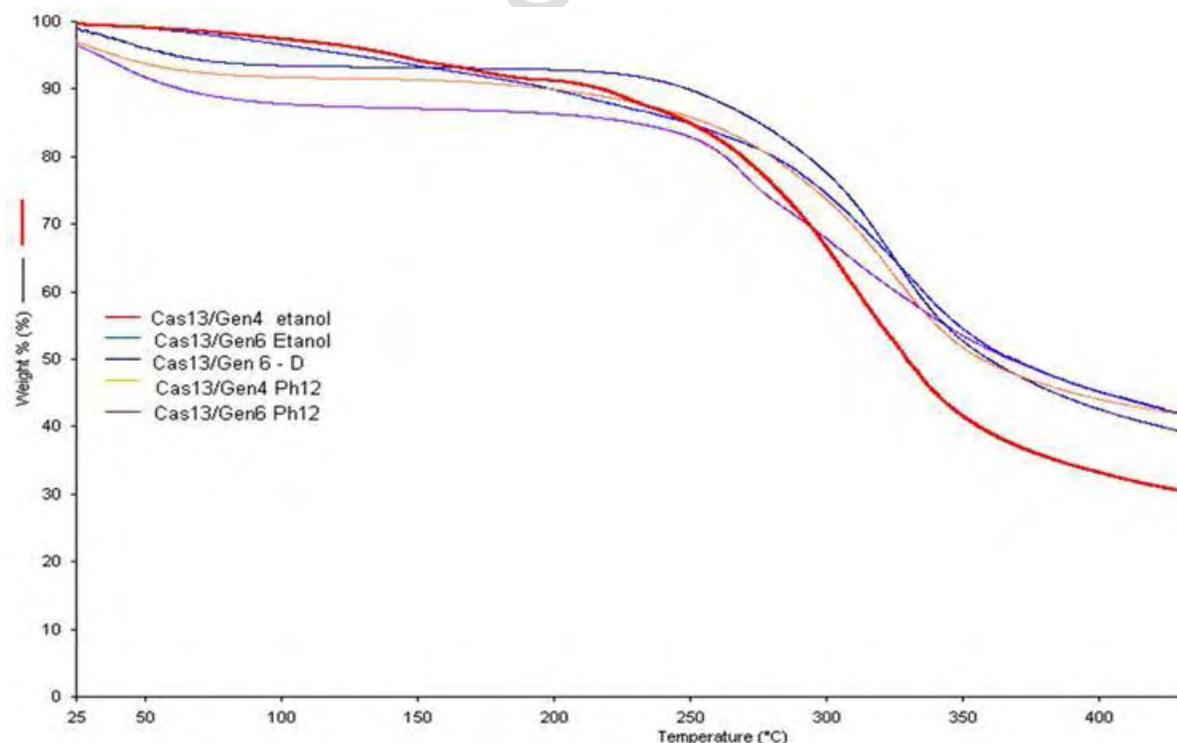
Tabla 14: Porcentajes de pérdida de masa durante la degradación térmica de los hidrogeles de caseína/genipina.

Muestra	% pérdida 1era. etapa	% pérdida 2da. etapa	% residuo final (a 430 °C)	% de residuo respecto a la matriz inicial
Caseína	9,4	55,0	34,60	38,2
CAS13/GEN6-D	88,5	6,4*	5,10*	44,3*
CAS13/GEN6	84,5	10,02	5,48	35,4
CAS13/GEN6-D (pH =12)	96,7	1,94	1,36	41,2

* Valores medidos a 370 °C.

En todos los casos se observó el mismo comportamiento de los hidrogeles, es decir, los termogramas solo varían en el porcentaje de masa perdida durante la primera etapa debido al solvente en el que se equilibra cada grupo de muestras y al grado de hinchamiento que posee cada muestra particular. Sin embargo, los resultados de la segunda etapa generan valores similares en la caseína sola y en los tres hidrogeles estudiados para la relación “residuo final/masa remanente de la matriz de caseína (luego de la salida del solvente)”, como puede apreciarse claramente en la tabla 14. Estos valores apoyarían la ocurrencia de un mecanismo de degradación similar al planteado para la caseína aunque se necesita evidencia adicional para confirmar tal situación. Sin embargo, estos resultados se obtuvieron a partir de los hidrogeles húmedos, por lo que se realizó un análisis del mismo tipo para los hidrogeles liofilizados. La figura 23 muestra la superposición de los termogramas obtenidos para cada hidrogel, allí se evidencia que el proceso ocurrió en dos etapas:

- la primera, atribuida a la pérdida de agua que pudo absorber la muestra luego de la liofilización,
- y la segunda debida a la descomposición de la matriz de los hidrogeles.

**Fig. 23:** Trazas de TGA de los hidrogeles liofilizados. Velocidad de barrido 10 °C/min. Bajo flujo de nitrógeno (50 mL/min.)

La tabla 15 muestra los resultados obtenidos en esta experiencia, los valores que allí se presentan son similares a los obtenidos en la etapa anterior para la segunda etapa de degradación y confirma que la primera etapa es debida a la pérdida de solvente.

Tabla 155: Porcentajes de pérdida de masa durante la degradación térmica de los hidrogeles de caseína/genipina liofilizados.

Muestra	% pérdida Etapa 1	Temp. (°C)	% pérdida Etapa 2	T (°C)	% residuo final (a 430 °C)	% de residuo respecto a la matriz del hidrogel
CAS13/GEN4	8,68	25-190	59,22	190-430	32,1	35,15
CAS13/GEN6	13,05	25-230	45,78	230-430	41,17	47,34
CAS13/GEN6-D	6,08	25-150	52,79	150-430	41,13	43,79
CAS13/GEN4-D (pH =12)	8,50	25-135	48,29	135-430	43,21	47,22
CAS13/GEN6-D (pH =12)	12,85	25-140	45,34	140-430	41,81	47,97

Por otro lado, se realizó un análisis espectroscópico de IRFT al residuo obtenido luego de realizado el análisis termogravimétrico, con el fin de analizar los posible grupos funcionales presentes al final de la degradación térmica. En la figura 24 se puede observar el espectro infrarrojo para el residuo de cada hidrogel analizado; es evidente que las señales que se muestran son de muy baja intensidad debido a la pequeña cantidad de solido obtenido.

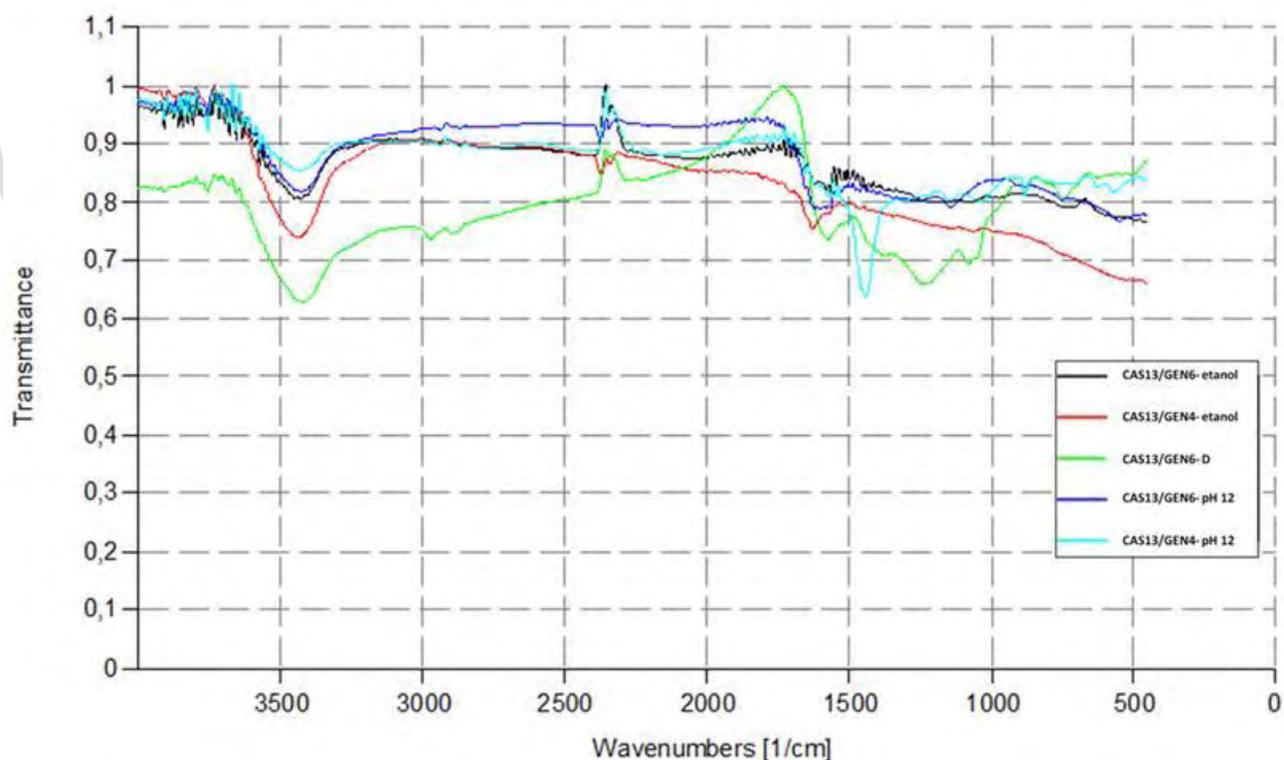


Fig. 24: Espectro IR de los residuos de TGA obtenidos para los distintos hidrogeles

En la tabla 16 se muestra la asignación de las bandas para cada espectro; en todos los casos existe un comportamiento similar en los que resalta la presencia de vibraciones de tensión N-H y C=O que pueden ser debidas a la presencia de grupos HNCO que aun no hayan sido degradados debido a la temperatura en la cual se trabajó.

Tabla 166: Asignación de las señales en el espectro de IRTF del residuo del TGA de los hidrogeles.

Grupo	CAS13/GEN6- etanol (cm ⁻¹)	CAS13/GEN4- etanol (cm ⁻¹)	CAS13/GEN6-D (cm ⁻¹)	CAS13/GEN6- pH 12 (cm ⁻¹)	CAS13/GEN4- pH 12 (cm ⁻¹)	Asignación
N-H	3426	3346	3424	3428	3440	Vibración de tensión N-H
C=O	1626	1628	1570	1622	1442	Vibración de tensión C=O amida

8.5. Estudios de hinchamiento de los hidrogeles

Cuando los geles se ponen en contacto con agua, ésta comienza a penetrar dentro de la red polimérica hasta alcanzar el equilibrio termodinámico (grado máximo de hinchamiento). Éste equilibrio es alcanzado cuando las fuerzas que generan las moléculas de agua para ingresar son igualadas por las fuerzas elásticas inversas que generan las cadenas de la red [65]. Dentro de las propiedades que hacen útiles a los hidrogeles una de la más importante es el grado de hinchamiento que éstos pueden alcanzar, ya que las demás propiedades (capacidad de absorción, cinética de hinchamiento, entre otras) están directamente influenciadas por ésta [66].

El estudio del proceso de hinchamiento de los hidrogeles se hizo mediante un análisis gravimétrico, siguiendo el incremento del peso con respecto al tiempo. Dicho seguimiento se realizó hasta el momento en que se alcanzó el equilibrio. Los grados de hinchamiento (% A) se calcularon a partir de la ecuación (6) [67].

$$\%A = 100x(m_h - m_s) / m_h \quad (6)$$

En este estudio de hinchamiento se realizó en diferentes medios acuosos (ajustando los valores del pH del medio entre 2 y 12 con HCl o NaOH) con hidrogeles obtenidos usando dos concentraciones diferentes de genipina (4 y 6 %). Las tablas desde la 19 hasta la 62, en la sección de apéndices, muestran los resultados para los distintos estudios de hinchamientos realizados.

En la figura 25 se presentan los resultados obtenidos durante el hinchamiento de las muestras CAS13/GEN4 en función del tiempo, para los medios con los distintos valores de pH estudiados. Se puede notar que estos hidrogeles solo logran un hinchamiento apreciable en medios con pH básico, específicamente a valores de pH > 10.

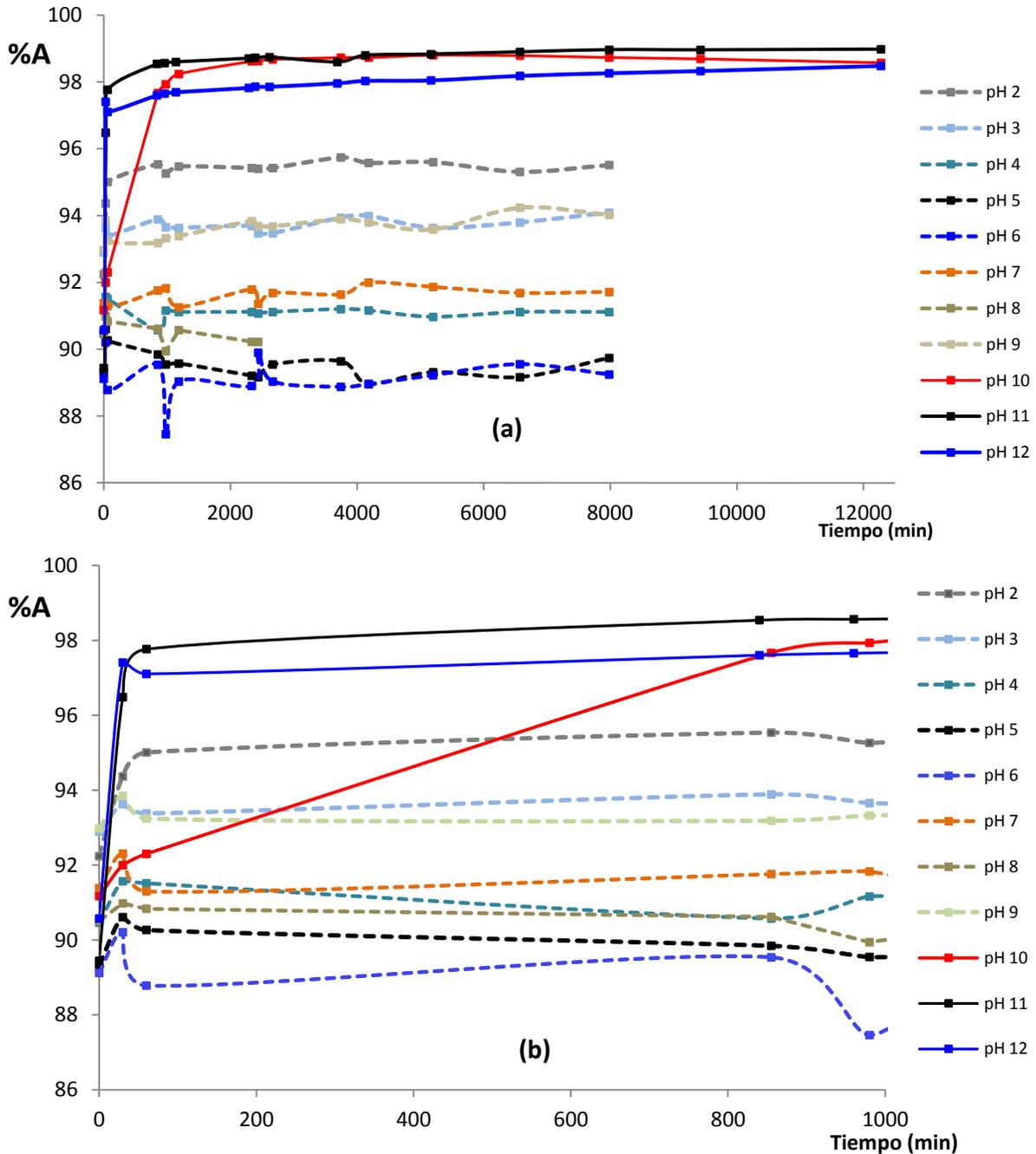


Fig. 25: (a) Comportamiento en el tiempo de los hidrogeles de CAS13/GEN4 para los diferentes valores de pH inicial del medio de hinchamiento (b) Ampliación de la zona inicial del estudio anterior (T =4 °C)

Un estudio similar fue realizado con las muestras de los hidrogeles de CAS13/GEN6. La figura 26 muestra el comportamiento de hinchamiento de éstos en los medios con los distintos valores de pH estudiados. En este caso también se puede observar que los hidrogeles con mayores grados de hinchamiento se obtienen para valores de pH altos, sin embargo se diferencia del estudio anterior en que el porcentaje de hinchamiento máximo es menor, siendo este resultado esperado puesto que cumple con la teoría clásica de hinchamiento de estos materiales, la cual establece una dependencia inversa del hinchamiento de un hidrogel con la concentración de agente entrecruzante, es decir, a menor grado de entrecruzamiento mayor es el hinchamiento [68].

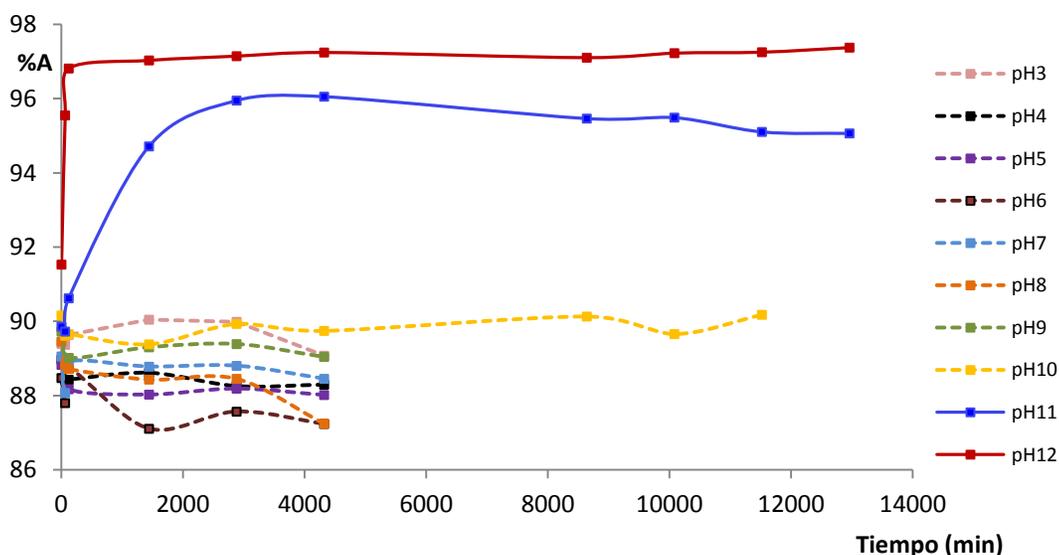


Fig. 26: Hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6 en medios acuosos a diferentes valores de pH (T =4 °C)

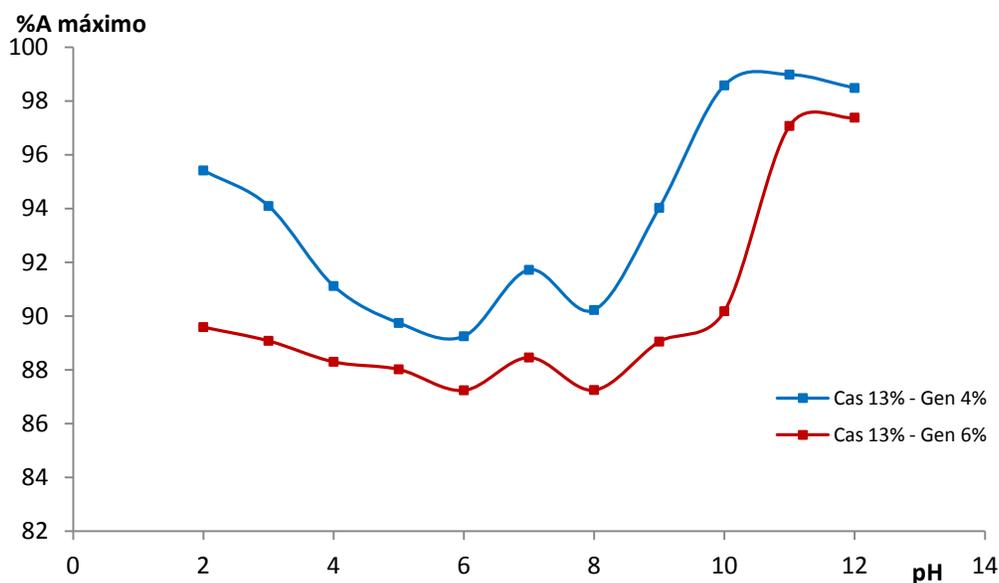


Fig. 27: Hinchamiento máximo de los hidrogeles de CAS13/GEN4 y CAS13/GEN6 en función del pH inicial del medio de hinchamiento (T =4 °C)

Se puede apreciar que el hinchamiento no solo depende de la concentración del agente entrecruzante, sino también del pH del medio (ver figura 27). Estos resultados permiten confirmar que mientras mayor cantidad de grupos logren ionizarse dentro del hidrogel éste logrará un mayor hinchamiento. En este caso, los grupos carboxílicos están más ionizados a pH más básicos mientras que los grupos amino lo harán a valores de pH ácidos, por lo cual se genera la curva con valores mínimos de hinchamiento a valores de pH neutro.

Por otro lado, las figuras 28 y 29 muestran las curvas de hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4-D y CAS13/GEN6-D, respectivamente, en medios acuosos con diferentes valores de pH. Se puede observar los hidrogeles de mayor hinchamiento son los que se ensayaron en medios muy básicos, similarmente a como ocurrió con los hidrogeles CAS13/GEN4 y CAS13/GEN6.

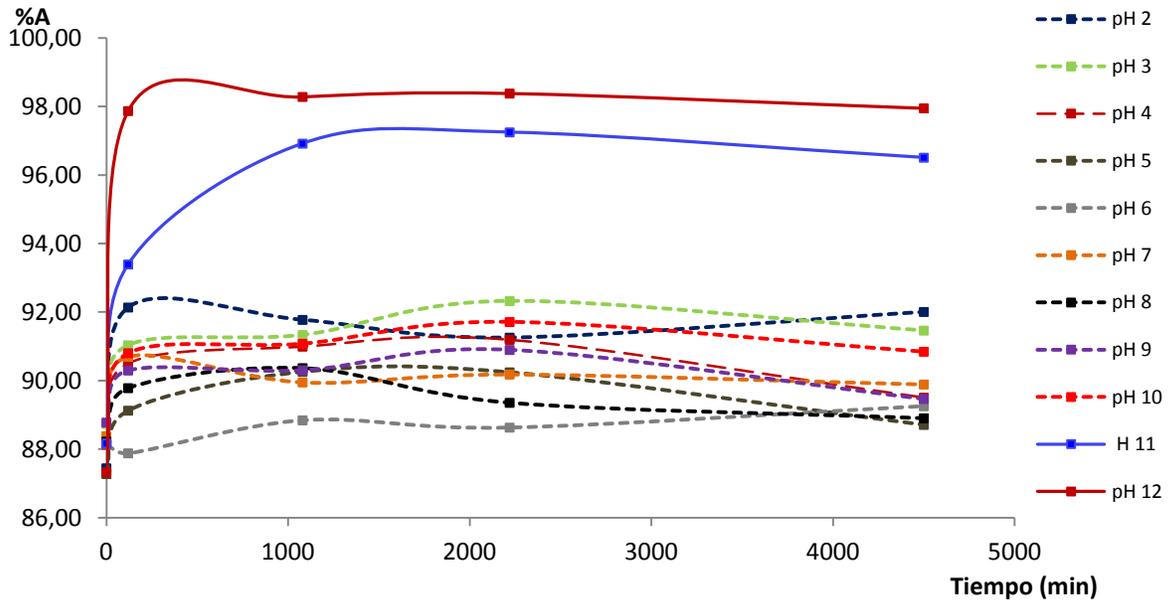


Fig. 28: Hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4-D. En medios acuosos a diferentes valores de pH (T =4 °C)

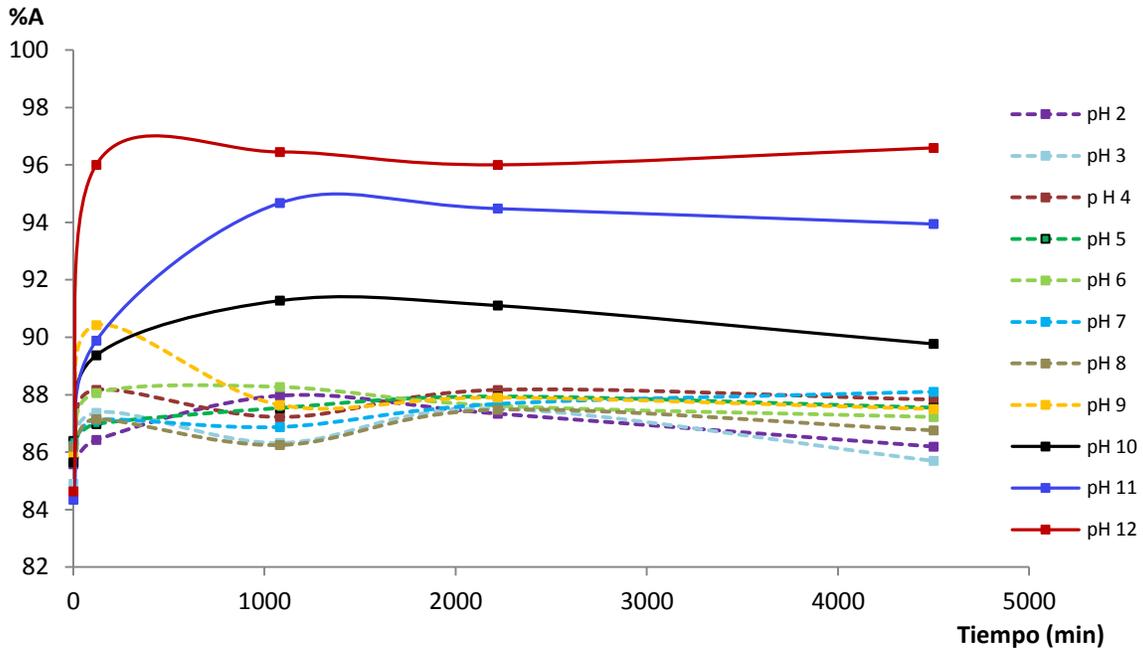


Fig. 29: Hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6-D. En medios acuosos a diferentes valores de pH (T =4 °C)

Al igual que para los hidrogeles CAS13/GEN4 y CAS13/GEN6, el hinchamiento de los hidrogeles CAS13/GEN4-D y CAS13/GEN6-D depende de la concentración de agente entrecruzante y del medio de hinchamiento. En la figura 30 los hidrogeles con 6 % de agente entrecruzante muestran menores valores de hinchamiento de equilibrio que los hidrogeles con 4 % de genipina, para todos los valores de pH inicial del medio de hinchamientos estudiados. Es destacable también que su comportamiento general es muy similar, a excepción de lo observado durante el hinchamiento en medios con valores de pH < 4. Tal situación pudiera ser atribuida al consumo adicional de grupos amino debido a la mayor cantidad de genipina adicionada en estos hidrogeles; en este sentido, es importante mencionar que el mecanismo de entrecruzamiento para la genipina es justamente su reacción con los grupos amino.

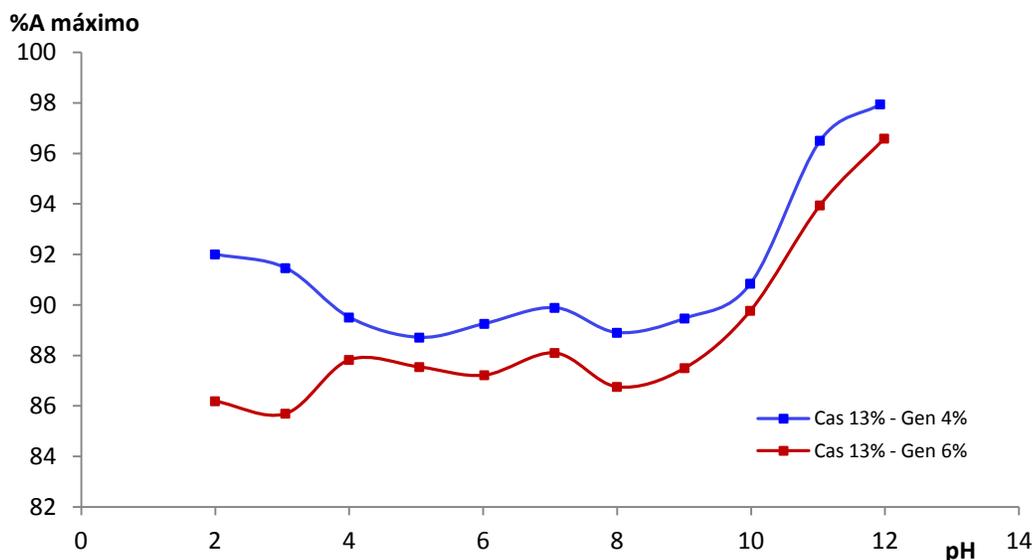


Fig. 30: Hinchamiento máximo de los hidrogeles de CAS13/GEN4-D y CAS13/GEN6-D en función del pH inicial del medio de hinchamiento ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Una observación importante sobre los sistemas estudiados se relaciona con la variación del pH inicial de algunos medios de hinchamiento (ver tabla 31-41, figura 31). Los cambios pueden considerarse realmente notorios para los medios con pH iniciales entre 8 y 10, lo que indica un aumento de valores en la concentración de protones a medida que los hidrogeles se van hinchando.

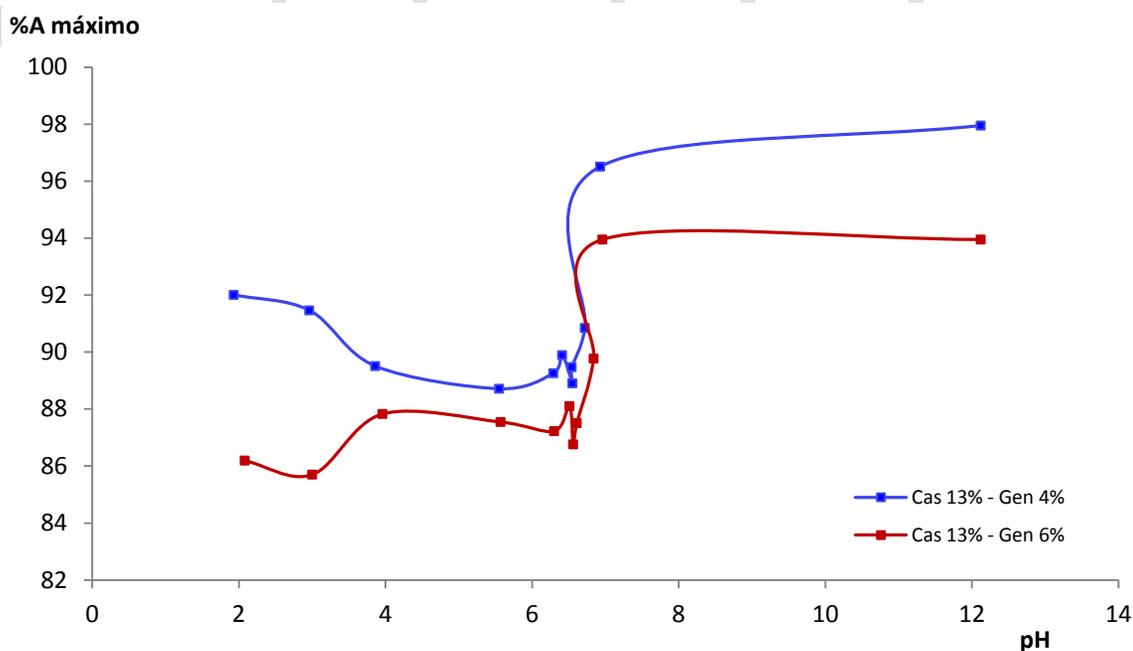


Fig. 31: Hinchamiento máximo de los hidrogeles con respecto al pH final a diferentes concentraciones, luego de dializar.

Finalmente, se puede realizar una clasificación de los hidrogeles obtenidos a partir de los valores de hinchamiento en el equilibrio, puesto que, los hidrogeles se suelen clasificar en función del contenido de agua que hayan absorbido [69].

Las tablas 17 y 18 muestra la clasificación de cada uno de los hidrogeles analizados, allí se observa claramente que los hidrogeles hinchados a pH 11 y 12 son los que absorben mayores cantidades de solvente.

Tabla 17: Clasificación del hinchamiento de los hidrogeles de CAS13/GEN4-D y CAS13/GEN6-D a los distintos valores de pH inicial del medio.

pH inicial del medio	CAS13/GEN4-D		CAS13/GEN6-D	
	% A	Clasificación [69]	% A	Clasificación [69]
2	92,00	Hinchamiento alto	86,19	Hinchamiento medio
3	91,46	Hinchamiento alto	85,69	Hinchamiento medio
4	89,50	Hinchamiento medio	87,82	Hinchamiento medio
5	88,71	Hinchamiento medio	87,54	Hinchamiento medio
6	89,25	Hinchamiento medio	87,22	Hinchamiento medio
7	89,88	Hinchamiento medio	88,10	Hinchamiento medio
8	88,90	Hinchamiento medio	86,75	Hinchamiento medio
9	89,46	Hinchamiento medio	87,50	Hinchamiento medio
10	90,84	Hinchamiento alto	89,77	Hinchamiento medio
11	96,50	Hinchamiento alto	93,94	Hinchamiento alto
12	97,94	Hinchamiento alto	96,59	Hinchamiento alto

Tabla 18: Clasificación del hinchamiento de los hidrogeles de CAS13/GEN4y CAS13/GEN6 a los distintos valores de pH inicial del medio.

pH del medio inicial	CAS13/GEN4		CAS13/GEN6	
	% A	Clasificación [Ref. Katime]	% A	Clasificación [Ref. Katime]
2	95,41	Hinchamiento alto	71,65	Hinchamiento medio
3	94,09	Hinchamiento alto	89,07	Hinchamiento medio
4	91,11	Hinchamiento alto	88,29	Hinchamiento medio
5	89,73	Hinchamiento medio	88,01	Hinchamiento medio
6	89,24	Hinchamiento medio	87,23	Hinchamiento medio
7	91,71	Hinchamiento alto	88,45	Hinchamiento medio
8	90,22	Hinchamiento alto	87,24	Hinchamiento medio
9	94,02	Hinchamiento alto	89,04	Hinchamiento medio
10	98,57	Hinchamiento alto	90,17	Hinchamiento alto
11	98,98	Hinchamiento alto	95,06	Hinchamiento alto
12	98,48	Hinchamiento alto	97,37	Hinchamiento alto

Por otro lado, a fin de poder realizar un análisis de la estructura de los hidrogeles las muestras se liofilizaron y se les realizó un estudio de microscopía electrónica de barrido. La figura 32 muestra fotografías de los hidrogeles posteriormente a su liofilización, tomadas en un microscopio óptico. Las diferencias entre ellas en forma, textura y, especialmente, en tamaño son evidentes.

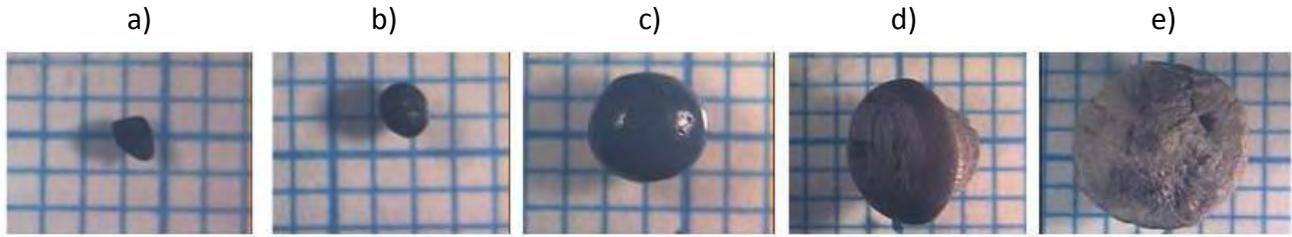


Fig. 32: Fotografías de hidrogeles liofilizados tomadas en un microscopio óptico: a) CAS13/GEN6-etanol. b) CAS13/GEN-etanol. c) CAS13/GEN6-D. d) CAS13/GEN6-pH 12. e) CAS13/GEN4-pH 12

En la microscopía electrónica de barrido estas diferencias se pueden observar más claramente. La figura 33a y 33b muestra las micrografías de los hidrogeles CAS13/GEN6-etanol y CAS13/GEN4-etanol, respectivamente. Allí se puede observar que el tamaño de poro para los hidrogeles de CAS13/GEN6-etanol es mayor que en el caso de los hidrogeles con concentración de agente entrecruzante menor siendo, algo contradictorio si se toma en cuenta que debería resultar lo contrario; sin embargo, esta contradicción pudiera ser aclarada por el hecho que en ambas microscopías se observa la presencia de microorganismos, que pudieron haber afectado el tamaño de los poros del hidrogel.

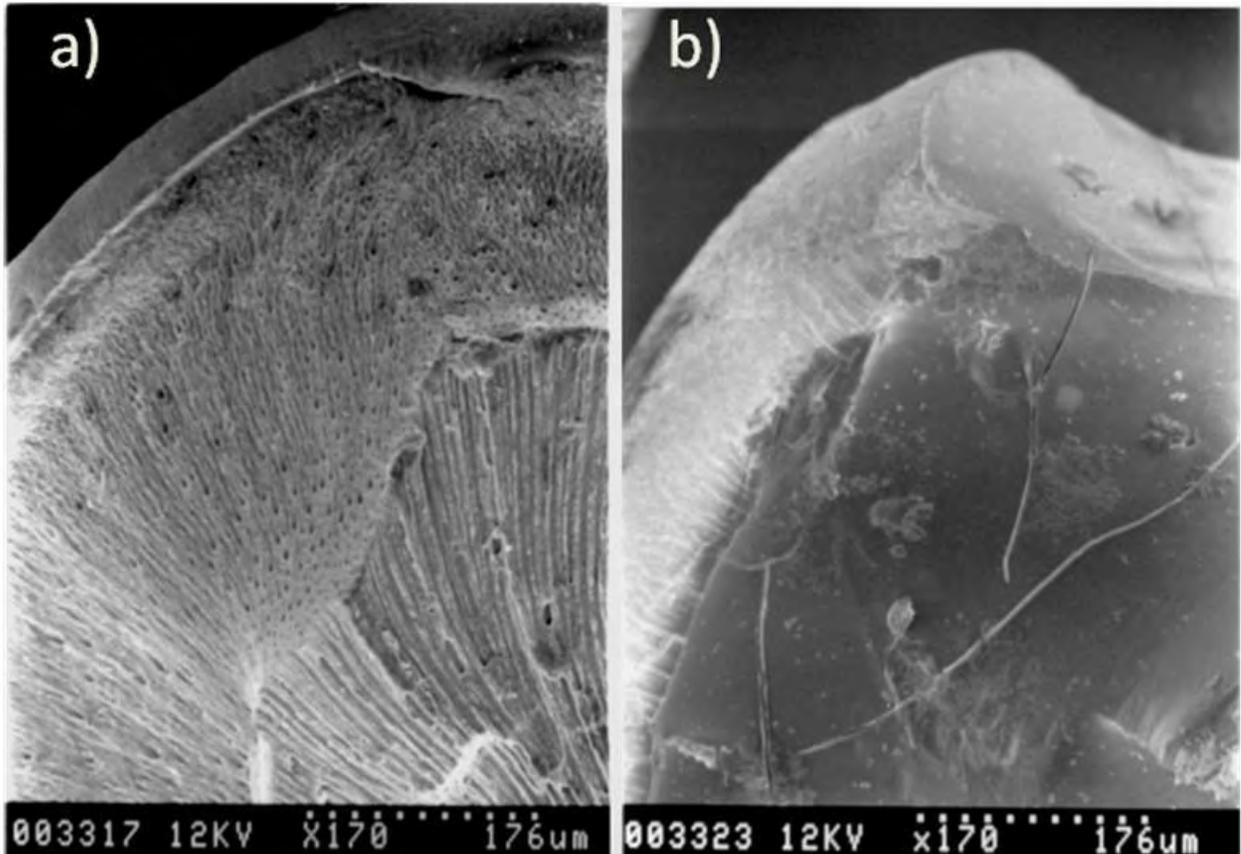


Fig. 33: Micrografías MEB de los hidrogeles conservados en alcohol y luego liofilizados: a) Hidrogel CAS13/GEN6-etanol. b) CAS13/GEN4-etanol.

La figura 34 muestra la micrografía del hidrogel CAS13/GEN6-D; se puede notar que el tamaño de poro es un poco más grande que en los hidrogeles del caso anterior. Aparentemente, la presencia de alcohol modifica la estructura de los hidrogeles compactando las cadenas presentes.

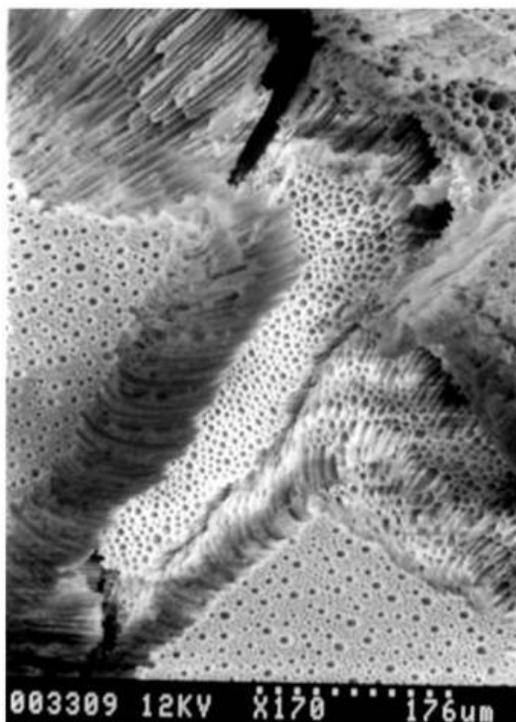


Fig. 34: Micrografía MEB del hidrogel CAS13/GEN6-D.

Un análisis similar se realizó para los hidrogeles CAS13/GEN6-pH 12: en este caso el poro resultó de mayor tamaño que en los casos anteriores, un resultado esperado puesto que el hidrogel se encontraba en su equilibrio de hinchamiento al momento de ser liofilizado, con lo cual sus cadenas deben estar más extendidas. Ello se evidencia de la figura 35a y su comparación con la figura 34 anteriormente analizada. La figura 35b muestra un aumento de la figura 35a y la figura 35c muestra un aumento de la figura 35b; esto se realizó a fin de tener una imagen detallada de la forma de los poros en estos hidrogeles.

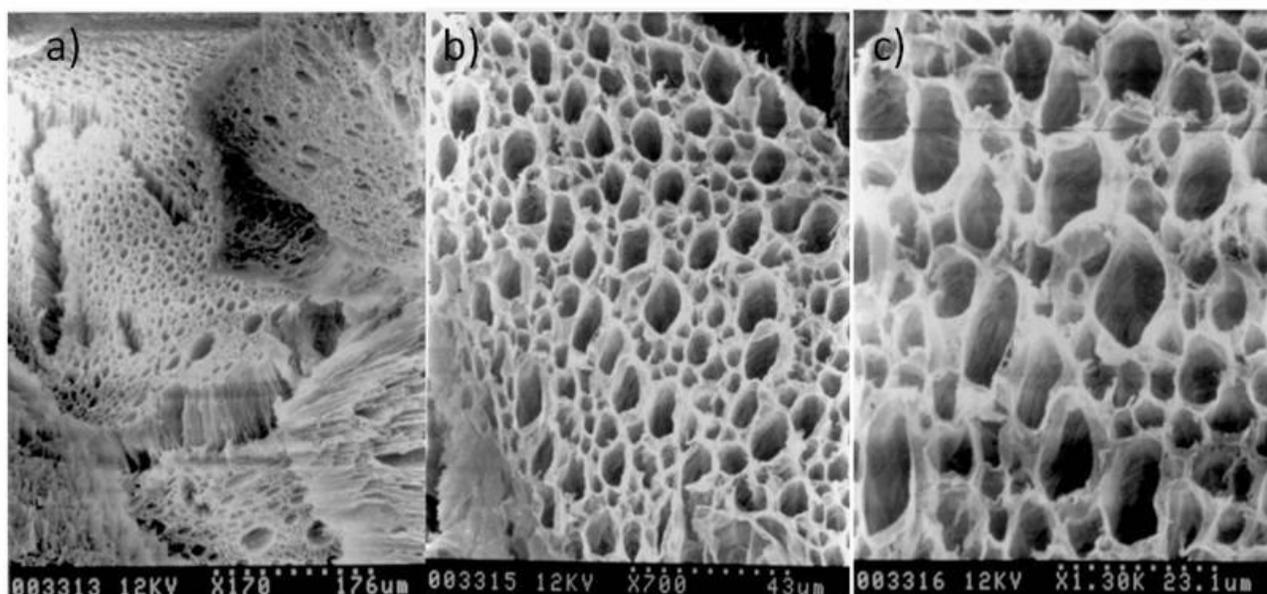


Fig. 35: Micrografías MEB del hidrogel CAS13/GEN6-pH 12 a diferentes aumentos: a) 170 aumentos. b) 700 aumentos. c) 1300 aumentos.

Finalmente, se muestra el análisis microscópico para los hidrogeles CAS13/GEN4-pH 12 (figura 36) que al ser comparado con los hidrogeles de CAS13/GEN6-pH 12 muestra una notoria diferencia en cuanto al tamaño de poro. De estas microfotografías resulta evidente que la concentración de agente entrecruzante juega un papel importante y que mientras se añada mayor cantidad de éste menor será el tamaño de poro. Al igual que para los hidrogeles analizados en la parte anterior, la figura 36 muestra varias fotografías tomadas con diferentes aumentos.

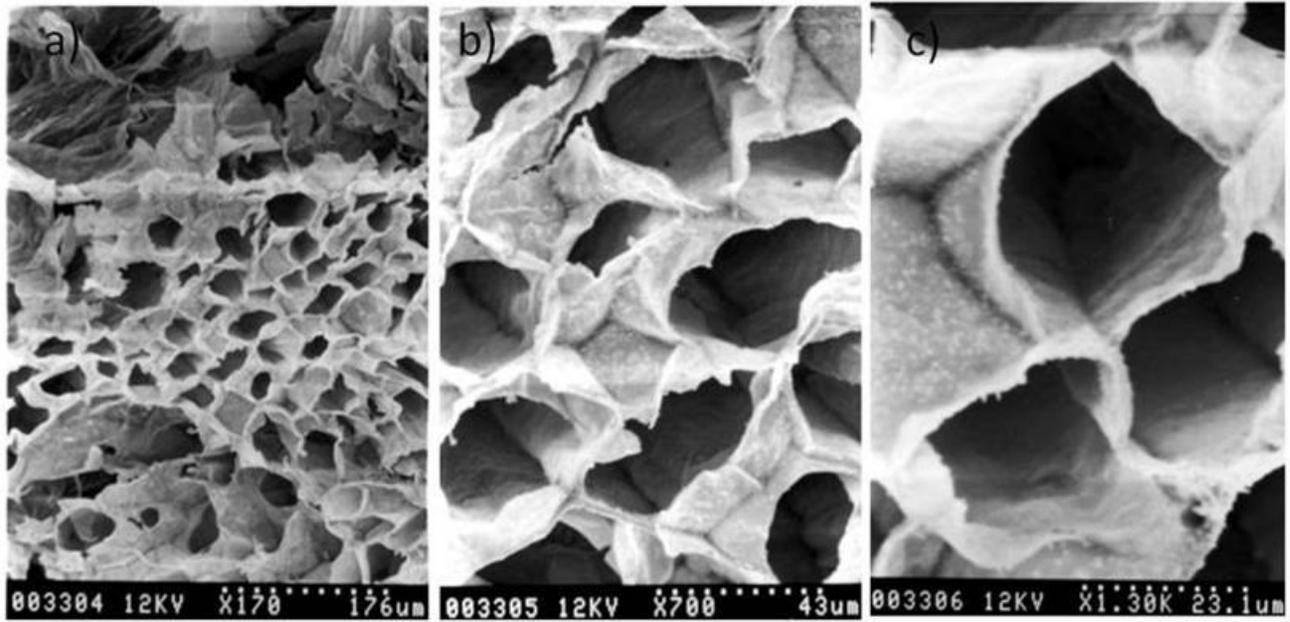


Fig. 36: Micrografías MEB del hidrogel CAS13/GEN4-pH 12 a diferentes aumentos: a) 170 aumentos. b) 700 aumentos. c) 1300 aumentos.

www.bdigital.ula.ve

9. CONCLUSIONES

Se logró la obtención de caseína a partir de leche bovina cruda usando el método de precipitación en su punto isoeléctrico, con un porcentaje de rendimiento promedio de $1,3 \pm 0,7$ %. La caseína aislada se caracterizó mediante espectroscopia infrarroja (IR), determinación del contenido proteico mediante el método de Kjeldahl micro-manual, electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se realizó su análisis termogravimétrico.

Se logró la síntesis de hidrogeles de caseína/genipina en forma de discos para diferentes concentraciones de agente entrecruzante. Se pudo determinar que en las condiciones ensayadas éstos no poseían buenas propiedades mecánicas y que, además, se fueron descomponiendo durante el transcurso de la reacción. De estas experiencias se recabó información que permitió preparar hidrogeles de caseína/genipina en forma de esferas, para dos concentraciones diferentes de genipina. Los hidrogeles obtenidos fueron estudiados mediante espectroscopia IRTF, microscopia electrónica y análisis termogravimétrico hasta 430 °C, observándose que los hidrogeles muestran una primera etapa de pérdida de peso asociada a la salida del agua presente en ellos seguida de una segunda pérdida de peso que parece seguir un curso similar al reportado para la degradación térmica de la caseína.

Los resultados de los estudios de hinchamiento obtenidos para las dos concentraciones de genipina usadas sugieren que los hidrogeles preparados obedecen la teoría clásica de estos materiales en relación a la dependencia inversa del grado de hinchamiento con la concentración de agente entrecruzante. Igualmente, se demostró que el pH del medio de hinchamiento es un factor importante a considerar para el hinchamiento de estos sistemas porque, tal como se espera de la ionización de los grupos carboxílicos en medio y de los grupos amina en medio ácido, los hidrogeles mostraron un hinchamiento menor a valores de pH neutro.

www.bdigital.ula.ve

10. RECOMENDACIONES

Debido a una serie de limitaciones que se presentaron durante el desarrollo del trabajo experimental, para la obtención de algunos reactivos y/o para la realización de ciertos análisis, quedaron por realizar los estudios de absorción/liberación de sustancias biológicamente activas con los hidrogeles.

Igualmente, es fundamental realizar los estudios de estabilidad de los hidrogeles preparados, en especial la optimización de las condiciones para su conservación.

Por otro lado, debido a la viabilidad de la preparación de éstas esferas se ve factible adaptar este sistema a la preparación de nanopartículas.

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. F López. Fundamentos de polímeros. VI Escuela Venezolana para la Enseñanza de la Química. 1-28. Mérida (2004).
2. C Lárez. Terminología básica de polímeros. Polímeros y Otros Materiales: Conceptos Básicos y Aplicaciones. Escuela Internacional Polímeros, V Sesión. Congreso Instruccional y Divulgativo. VII Curso de aplicación de polímeros. 8-12. Mérida-Venezuela (2004).
3. D García, J Escobar, M Bocourt, N Bada, D Zaldivar, I Katime. Influencia del entrecruzante y la composición en hidrogeles de poli (ácido itacónico-co-ácido metacrílico). **Rev. Iberoamer. Polímeros**, **4(1)**, 93-105 (2003).
4. M Martinelli, P Froimowicz, M Calderón, M Strumia. Materiales Poliméricos Funcionalizados. PARTE I: Síntesis y polimerización de monómeros funcionalizados. **Rev. Iberoamer. Polímeros**, **4(4)**, 30-47 (2013).
5. B Rojas, M Rojas, A Tomas, J Prin, M Ramírez, Alejandro Müller. Estudio de las propiedades mecánicas y aplicaciones de los polímeros con redes expandibles (hidrogeles). **Rev. LatinoAmer. Metal. Mat., Suplemento 2(1)**, 25-26 (2009).
6. N Santoni, M Matos, C Müller-Karger, H Nicola, M Sabino, A Müller. Caracterización de hidrogeles de quitosano entrecruzados covalentemente con genipina. **Rev. Iberoamer. Polímeros**, **9(3)**, 326-330 (2008).
7. G Álvarez. Extracción, caracterización y valoración de genipina a partir del fruto de la Genipa americana. Universidad ICESI, Facultad de Ciencias Naturales, Departamento Ciencias Químicas Santiago de Cali. Trabajo de grado para optar por el título de Químico Farmacéutico (2013).
8. N Pinzón, J Espinosa, E Hernáez, I Katime. Modelamiento del hinchamiento y difusión de solutos en hidrogeles. **Rev. Iberoamer. Polímeros**, **3(2)**, 38-54 (2002).
9. M Vincent, S Álvarez, Zaragoza. Ingeniería Química Nuclear. Ciencia y tecnología de los polímeros. Universidad Politécnica de Valencia. Capítulo 1. 7-17. (2006).
10. C Lárez. Terminología básica de polímeros. Nivel universitario. Biomateriales, Polímeros Petroquímicos y sus Mezclas: Características y nuevos hallazgos. Escuela Internacional Polímeros, VI Sesión. Congreso Instruccional y Divulgativo. 401-458. Mérida-Venezuela (2007).
11. A Besednjak. Materiales compuestos. Quality Impres, S.L. 20. Barcelona-España (2005).
12. M Maier. Polímeros. Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). Buenos Aires- Argentina (2004).
13. V Sáez, E Hernáez, L Sanz. Liberación controlada de fármacos. Hidrogeles. **Rev. Iberoamer. Polímeros**, **4(1)**, 21-91 (2003).
14. L Bejarano, B Rojas, J L Prin, M Mohsin, A García, M Britt, L Rojas, M Ramírez, I Katime. Síntesis y estudio de hidrogeles obtenidos a partir de acrilamida, poli(ácido acrílico) y ácido maleico como potenciales remediadores de contaminantes metálicos en aguas residuales. **Rev. Iberoamer. Polímeros**, **9(3)**, 307-312 (2008).
15. A Vara. Los polímeros en medicina.
<http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/hidrogeles.htm>.

[Consultado: 24/11/2013 10:30 am.]

16. R Infante. Los polímeros en medicina
http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/ingenieria_de_tejidos.htm
[consultado: 24/11/2013 11:30 am.]
17. N Santoni, M Matos, C Müller-Karger, H Nicola, M Sabino, A Müller. Caracterización de Hidrogeles de Quitosano Entrecruzados covalentemente con Genipina. **Rev. Iberoamer. Polímeros**, **9(3)**, 326-330(2008).
18. JL Escobar, D M García, D Zaldivar, I Katime. Hidrogeles, principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos. **Rev. Iberoamer. Polímeros**, **3(3)**, 1-25 (2002).
19. I Katime, O Katime, D Katime. Materiales inteligentes: hidrogeles macromoleculares. Algunas aplicaciones biomédicas. **Anales de la Real Sociedad Española de Química**. 35-50 (2005)
20. M Saldivar, N Galego, M Rapado, C Gastón, S Altanés, G Barreras. Evaluación de las características térmicas y de la cinética de hinchamiento de una red polimérica semi-interpenetrada obtenida mediante radiaciones gamma. **Rev. Cubana de Química**, **21(3)**, 76-81 (2009).
21. B Bursten. Química la ciencia central. 9ª ed. Editorial Pearson Prentice Hall. 460-462. México (2004)
22. D Soto, H Oliva. Métodos para preparar hidrogeles químicos y físicos basados en almidón: Una revisión. **Rev. Iberoamer. Metalurgia y Materiales**, **32(2)**, 154-175 (2012).
23. L Wade. Química Orgánica. 5ª ed. Pearson Prentice Hall. 492-495, 1114-1122. España (2008).
24. S Damodaran, K Parkin, O Fennema. Química de los alimentos. ACRIBIA, S. A. 887-898. Zaragoza- España (2000).
25. J M Soriano. Nutrición básica humana. Editorial PUV. Universidad de Valencia. 121 (2006).
26. J M Teijón, A Garrido, D Blanco, C Villaverde, J Ramírez. Fundamentos de bioquímica estructural. Tébar, S. L. 71-74. Madrid – España (2006).
27. J Aranceta, LI Serra. Leche, Lácteos y Salud. Editorial médica panamericana. Instituto omega 3. 20. España (2004)
28. V Rodríguez, E Magro. Bases de las alimentación humana. Nebiblo. 52. España (2008).
29. E Battaner. Biomoléculas. Una introducción estructural a la bioquímica. Ediciones Universidad de Salamanca. 251. España (2012).
30. E Ferrandini, M Castillo, M. B López, J Laencina. Modelos estructurales de la micela de caseína. **AN. VET.** 22. 5-18 (2006).
31. R Anderson, D Bendell, P Groundwater. Organic Spectroscopic Analysis. The Royal Society of Chemistry. 24-50 Italy (2004).
32. D Carroz. Química Orgánica Básica. 3ª ed. Tomo II. Publicaciones Vicerrectorado Académico. 758-763. Mérida-Venezuela (2009).
33. D Skoog, D West, F. J Holler, S Crouch. Fundamentos de Química Analítica. 8ª ed. Thomson.
34. R Morrison, R Boyd. Química Orgánica 5ª Ed. Pearson Addison Wesley. México (1998).

35. D Browning. Cromatografía. McGraw Hill. 51-82. Barcelona- España (1971).
36. D Skoog, F Holler, T Nieman. Principios de Análisis Instrumental. 5ª ed. McGraw Hill. 730-734. España (2001)
37. J Costa. Diccionario de química física. I ed. 110-111. Madrid-España (2005).
38. H García. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. **Universo Diagnostico., 1(2)**, 31-41(2000)
39. A Medina. Generalidades y aplicaciones de electroforesis. Cuaderno FIRP 617. Modulo de enseñanza en fenómenos interfaciales. Universidad de Los Andes. 1-23. Mérida- Venezuela (1994).
40. J. M. Costa. Diccionario de química física. Universidad de Barcelona.373-374. España (2005).
41. E Ceccotti, R Sfforza El diagnostico en clínica estomatológica. Editorial Médica Panamericana. 76-77. Buenos Aires - Argentina (2007).
42. V Arce, P Catalina, F Mallo. Endocrinología. Universidad de Vigo. 380-381. España (2006).
43. C Poole, F Owens. Introducción a la nanotecnología. Editorial Reverté. 51-53. Barcelona - España (2007).
44. G Brown, E Sallee Química cuantitativa. Editorial Reverté. 222-223. Barcelona - España (1977).
45. D Harris. Análisis químico cuantitativo. 3ª ed. Editorial Reverté. 132-133. España (2007).
46. I Sierra, D Pérez, S Gómez, S Morante. Análisis instrumental. Netbiblo. 206-208. España (2010).
47. M Wilches, Luis Ruiz, M Hernández. Bioingeniería VI. Fundamentos de instrumentación para la química clínica y las radiaciones ionizantes. Editorial Universidad de Antioquia. 247-249. Colombia (2007).
48. F Song, L Zhang, C Yang, L Yan. Genipin – crosslinked casein hydrogels for controlled drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics, 373**, 41-47 (2009).
49. P Qi, A Nuñez, E Wickham. Reactions Between β -Lactoglobulin and Genipin: Kinetics and Characterization of the Products. **J. Agric. Food Chem., 60**, 4327-4335 (2012)
50. D A Lonergan. Isolation of Casein by Ultrafiltration and Cryodestabilization. **J. of Food Science, 48**, 1817-1825 (1983)
51. R Vielma, A Medina. Determinación de la composición química y estudios de solubilidad en la harina de lombriz *Eisenia foetida*. **Rev. Fac. Farmacia, 48(1)**, 2-8, (2006).
52. A Rivas. Obtención y caracterización del entrecruzante natural genipina a partir del fruto del caruto (*Genipa americana* L.). (Licenciatura en Química) - Laboratorio de Polímeros, Universidad de Los Andes. Mérida –Venezuela (2014).
53. Association of Analytical Chemist (AOAC). Official Methods of Analysis, Association of Analytical Chemists. 14^{ta} ed. Virginia – USA (1986).
54. H Laitinen, W Harris. Análisis químico. Editorial reverté, sa. 116. Barcelona (1982).
55. R Vielma. Estudio físico-químico y funcional de las proteínas de la lombriz *Eisenia Foetida*. (Doctorado en Ciencias aplicadas) - Universidad de Los Andes. Mérida –Venezuela (2004).

56. C Djerassi, J Gray, F Kincl. Naturally Occurring Oxygen Heterocyclics. IX. Isolation and Characterization of Genipin. **J. Organic Chemistry**, **25(12)**, 2174-2177 (1960).
57. Guilherme J. Esferas de goma do cajueiro e quitosana para liberação de fármacos. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza- Brasil (2007).
58. S Trevor, M Butler, S Adams, P Laity, J Burley, R Cameron. Structure and phase transition of genipin, an herbal medicine and naturally occurring cross-linker. **Crystal Growth & Design**, **8(5)**, 1748-1753 (2008).
59. S Di Tommaso, P David, K Picolet, M Gabant, H David, J Moranças, J Gomar, F Leroy, C Adamo. Structure of genipin in solution: a combined experimental and theoretical study. **RSC Adv.**, **3**, 13764–13771 (2013).
60. D Skoog, D West. Introducción a la química analítica. Editorial reverté, sa. 330-331. España (2002)
61. E Patiño. Factores que afectan las propiedades físicas y la composición química de la leche de búfalas (*Bubalus bubalis*) en Corrientes Argentinas. **Rev. Vet**, **15(1)**, 21–25 (2004).
62. D Barbano, M Dellavalle. Rapid Method for Determination of Milk Casein Content by Infrared Analysis. **J. Dairy Sci.**, **70**, 1524-1528(1987).
63. M Pardo, C Natalucci. Electrophoretic Analysis (Tricine-SDS-PAGE) of Bovine Caseins. **Acta Farm. Bonaerense**, **21(1)**, 57-60 (2002).
64. C Moldoveanu, L Odochian, C Paius, I Lorela, A Baiceanu. Study on the thermal behavior of casein in air. **Acta Chem. IASI**, **21**, 31-46 (2013).
65. J Cuggino. Sistema de hidrogeles para su posible aplicación en liberación controlada de drogas. Asociación Argentina de materiales, 16-17 (2008).
66. J Escobar, D García, A Valerino, D Zaldivar, I Katime. Influencia de la temperatura y la composición en el proceso de hinchamiento en hidrogeles de poli-(n-isopropilacrilamida-co-N,N-dimetilacrilamida). **Rev. Iberoamer. Polímeros**, **3(1)**, (2001).
67. F Zuluaga, N Valderruten, F Muñoz. Síntesis y estudio de hidrogeles de acrilamida/ácido metacrílico y su aplicación en la liberación de fármacos. **El hombre y la máquina**, **(27)**, 100-107 (2006).
68. P Flory. Principles of Polymer Chemistry; Cornell University: Ithaca, NY (1953).
69. I Katime, O Katime, D Katime. Los materiales inteligentes de este milenio: Los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones. Bilbao: Servicio editorial. Universidad del País Vasco, pp. 45-53 (1990).

APÉNDICES

Propagación de errores en la determinación del porcentaje de nitrógeno en las caseínas obtenidas

- Determinación del error asociado a la normalidad del carbonato de sodio (Ncs):

$$N_{cs} = \frac{m}{PE_{xV}}$$

$$N_{cs} = \frac{0,2102g}{(53g/eq) \times 0,1L}$$

$$N_{cs} = 0,0396 \text{ eq/L}$$

$$\Delta N_{cs} = \left| \frac{\partial N_{cs}}{\partial m} \right| |\Delta m| + \left| \frac{\partial N_{cs}}{\partial V} \right| |\Delta V|$$

$$\left| \frac{\partial N_{cs}}{\partial m} \right| = \left| \frac{1}{PE_{xV}} \right|; |\Delta V| = 0,1 \text{ mL}; \text{apreciación de la bureta empleada para medir el volumen.}$$

$$\left| \frac{\partial N_{cs}}{\partial V} \right| = \left| -\frac{m}{PE_{xV}^2} \right|; |\Delta m| = 0,0001 \text{ g}; \text{apreciación de la balanza empleada.}$$

$$\Delta N_{cs} = \left| \frac{1}{PE_{xV}} \right| |\Delta m| + \left| -\frac{m}{PE_{xV}^2} \right| |\Delta V| = \Delta N_{cs} = \left| \frac{1}{\frac{53g}{eq} \times 0,1L} \right| |0,0001g| + \left| -\frac{0,2102g}{\frac{53g}{eq} \times (0,1L)^2} \right| |0,0001L|$$

$$\Delta N_{cs} = 6 \times 10^{-5} N$$

$$N_{cs} = (3960 \pm 6) \times 10^{-5} N = 0,03960 \pm 0,00006 N = 0,0396 \pm 0,0001 N$$

- Determinación del error asociado a la normalidad del ácido clorhídrico (Nac):

$$N_{ac} \times V_{ac} = N_{cs} \times V_{cs}$$

$$N_{ac} = N_{cs} \times V_{cs} / V_{ac}$$

$$N_{ac} = 3960 \times 10^{-5} N \times 20 \text{ mL} / 38,7 \text{ mL}$$

$$N_{ac} = 0,0205 N$$

$$\Delta N_{ac} = \left| \frac{\partial N_{ac}}{\partial N_{cs}} \right| |\Delta N_{cs}| + \left| \frac{\partial N_{ac}}{\partial V_{cs}} \right| |\Delta V_{cs}| + \left| \frac{\partial N_{ac}}{\partial V_{ac}} \right| |\Delta V_{ac}|$$

$$\left| \frac{\partial N_{ac}}{\partial N_{cs}} \right| = \frac{V_{cs}}{V_{ac}}$$

$$\left| \frac{\partial N_{ac}}{\partial V_{cs}} \right| = \frac{N_{cs}}{V_{ac}}$$

$$\left| \frac{\partial N_{ac}}{\partial V_{ac}} \right| = -\frac{V_{cs} \times V_{cs}}{V_{ac}^2}$$

$$\Delta N_{ac} = \left| \frac{V_{cs}}{V_{ac}} \right| |\Delta N_{cs}| + \left| \frac{N_{cs}}{V_{ac}} \right| |\Delta V_{cs}| + \left| -\frac{N_{cs} \times V_{cs}}{V_{ac}^2} \right| |\Delta V_{ac}|$$

$$\Delta N_{ac} = \left| \frac{20 \text{ mL}}{38,7 \text{ mL}} \right| |0,0001 N| + \left| \frac{0,0396 N}{38,7 \text{ mL}} \right| |0,02 \text{ mL}| + \left| -\frac{0,0396 N \times 20 \text{ mL}}{(38,7 \text{ mL})^2} \right| |0,1 \text{ mL}|$$

$$\Delta N_{ac} = 0,0001 N$$

$$N_{ac} = 0,0205 \pm 0,0001 N$$

- Determinación del error asociado al porcentaje de nitrógeno:

Tabla 19: Valores de masa y volumen de titulante usados en la determinación del porcentaje de nitrógeno para las caseínas obtenidas.

Muestra	Experiencia 1	Experiencia 2	Experiencia 3
M1	a=0,1074±0,0001 g V _{HCl} =56,1±0,1 mL	a=0,1088±0,0001 g V _{HCl} =56,6±0,1 mL	a=0,1111±0,0001 g V _{HCl} =56,3±0,1 mL
M2	a=0,1008±0,0001 g V _{HCl} =45,0±0,1 mL	a=0,1026±0,0001 g V _{HCl} =45,5±0,1 mL	a=0,1106±0,0001 g V _{HCl} =49,4±0,1 mL
M3	a=0,1036±0,0001 g V _{HCl} =54,8±0,1 mL	a=0,1077±0,0001 g V _{HCl} =54,2±0,1 mL	a=0,1012±0,0001 g V _{HCl} =51,0±0,1 mL

El porcentaje de nitrógeno es determinado mediante la ecuación siguiente:

$$\%N = \frac{VxNxM}{10xa}$$

El cálculo del error absoluto se realizó utilizando el método de derivadas parciales, el cual viene dado por:

$$\Delta\%N = \left| \frac{\partial\%N}{\partial V} \right| |\Delta V| + \left| \frac{\partial\%N}{\partial a} \right| |\Delta a|$$

$$\left| \frac{\partial\%N}{\partial V} \right| = \left| \frac{NxM}{10xa} \right|; |\Delta V| = 0,1 \text{ mL}; \text{apreciación de la bureta empleada para medir el volumen}$$

$$\left| \frac{\partial\%N}{\partial a} \right| = \left| -\frac{VxNxM}{10xa^2} \right|; |\Delta a| = 0,0001 \text{ g (apreciación de la balanza empleada)}$$

Sustituyendo valores en la ecuación que define ΔN ,

$$\Delta\%N = \left| \frac{NxM}{10xa} \right| |\Delta V| + \left| -\frac{VxNxM}{10xa^2} \right| |\Delta a|$$

Para M1 (Experiencia 1):

$$\Delta\%N = \left[\left[\frac{0,0205 \text{ eq/L} \times 14 \text{ g/eq}}{10 \times 0,1074 \text{ g}} \right] \times 0,1 \text{ mL} + \left[\frac{56,1 \text{ mL} \times 0,0205 \text{ eq/L} \times 14 \text{ g/eq}}{(10 \times (0,1074 \text{ g})^2)} \right] \times 0,0001 \text{ g} \right]$$

$$\Delta\%N = 0,01$$

$$\%N = \frac{56,1 \text{ mL} \times 0,0205 \text{ eq/L} \times 14 \text{ g/eq}}{10 \times 0,1074 \text{ g}} = 14,99$$

$$\%N = 14,99 \pm 0,01$$

- Determinación del error asociado al porcentaje de nitrógeno:

El porcentaje de proteína es determinado mediante la ecuación siguiente:

$$\%P = \%N \times 6,38$$

$$\Delta\%P = \left| \frac{\partial\%P}{\partial\%N} \right| \times |\Delta\%N|; \quad \left| \frac{\partial\%P}{\partial\%N} \right| = 6,38; \quad |\Delta\%N| = 0,01$$

Para M1 (Experiencia 1):

$$\Delta\%P = |6,38| \times |0,01| = 0,06$$

$$\%P = 14,99 \times 6,38 = 95,64$$

$$\%P = 95,64 \pm 0,06$$

Tabla 20: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4 a pH=2.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Promedio	s	%E
0	0,0116	92,0366	0,0119	92,2374	92,1370	0,1420	0,15
30	0,016	94,2266	0,0164	94,3674	94,2970	0,0996	0,11
60	0,0174	94,6911	0,0185	95,0068	94,8489	0,2232	0,24
855	0,0191	95,1636	0,0207	95,5374	95,3505	0,2643	0,28
980	0,0193	95,2137	0,0195	95,2628	95,2383	0,0347	0,04
1185	0,0193	95,2137	0,0204	95,4718	95,3428	0,1825	0,19
2339	0,0201	95,4042	0,0202	95,4270	95,4156	0,0161	0,02
2440	0,0182	94,9245	0,0201	95,4042	95,1643	0,3393	0,36
2670	0,0194	95,2384	0,0202	95,4270	95,3327	0,1333	0,14
3746	0,0202	95,4270	0,0217	95,7431	95,5850	0,2235	0,23
4185	0,0203	95,4495	0,0209	95,5801	95,5148	0,0924	0,10
5204	0,0196	95,2870	0,021	95,6012	95,4441	0,2222	0,23
6575	0,0192	95,1888	0,0197	95,3109	95,2499	0,0863	0,09
7985	0,0197	95,3109	0,0206	95,5158	95,4133	0,1449	0,15

Tabla 21: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4 a pH=3.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Promedio	s	%E
0	0,0234	96,0524	0,009	89,7361	92,8942	4,4663	4,81
30	0,0278	96,6772	0,0098	90,5740	93,6256	4,3156	4,61
60	0,0279	96,6891	0,0093	90,0672	93,3781	4,6824	5,01
855	0,0300	96,9208	0,0101	90,8540	93,8874	4,2899	4,57
980	0,0283	96,7359	0,0098	90,5740	93,6549	4,3571	4,65
1185	0,0279	96,6891	0,0098	90,5740	93,6315	4,3240	4,62
2339	0,0289	96,8036	0,0098	90,5740	93,6888	4,4050	4,70
2440	0,0286	96,7701	0,0094	90,1729	93,4715	4,6649	4,99
2670	0,0286	96,7701	0,0094	90,1729	93,4715	4,6649	4,99
3746	0,0271	96,5913	0,0106	91,2854	93,9384	3,7519	3,99
4185	0,0294	96,8580	0,0104	91,1178	93,9879	4,0589	4,32
5204	0,0307	96,9910	0,0095	90,2763	93,6337	4,7480	5,07
6575	0,0291	96,8256	0,01	90,7625	93,7941	4,2873	4,57
7985	0,0306	96,9812	0,0105	91,2024	94,0918	4,0862	4,34

Tabla 22: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4 a pH=4.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Promedio	s	%E
0	0,0101	90,8540	0,0093	90,0672	90,4606	0,5563	0,61
30	0,0117	92,1047	0,0103	91,0316	91,5681	0,7588	0,83
60	0,0113	91,8252	0,0105	91,2024	91,5138	0,4404	0,48
855	0,0099	90,6692	0,0097	90,4768	90,5730	0,1360	0,15
980	0,0105	91,2024	0,0104	91,1178	91,1601	0,0598	0,07
1185	0,0106	91,2854	0,0102	90,9436	91,1145	0,2417	0,27
2339	0,0105	91,2024	0,0103	91,0316	91,1170	0,1208	0,13
2440	0,0105	91,2024	0,0102	90,9436	91,0730	0,1830	0,20
2670	0,0105	91,2024	0,0103	91,0316	91,1170	0,1208	0,13
3746	0,0106	91,2854	0,0104	91,1178	91,2016	0,1185	0,13
4185	0,0112	91,7522	0,0098	90,5740	91,1631	0,8332	0,91
5204	0,0107	91,3668	0,0098	90,5740	90,9704	0,5606	0,62
6575	0,0106	91,2854	0,0102	90,9436	91,1145	0,2417	0,27
7985	0,0106	91,2854	0,0102	90,9436	91,1145	0,2417	0,27

Tabla 23: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4 a pH=5.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Promedio	s	%E
0	0,0087	89,3822	0,0086	89,2587	89,3205	0,0873	0,10
30	0,0107	91,3668	0,0091	89,8489	90,6079	1,0733	1,18
60	0,0098	90,5740	0,0092	89,9592	90,2666	0,4347	0,48
855	0,0093	90,0672	0,0089	89,6208	89,8440	0,3157	0,35
980	0,0092	89,9592	0,0085	89,1324	89,5458	0,5847	0,65
1185	0,0095	90,2763	0,0083	88,8705	89,5734	0,9941	1,11
2339	0,0092	89,9592	0,008	88,4531	89,2062	1,0650	1,19
2440	0,009	89,7361	0,0081	88,5957	89,1659	0,8064	0,90
2670	0,0092	89,9592	0,0085	89,1324	89,5458	0,5847	0,65
3746	0,0095	90,2763	0,0084	89,0030	89,6396	0,9004	1,00
4185	0,0089	89,6208	0,0079	88,3070	88,9639	0,9290	1,04
5204	0,0089	89,6208	0,0084	89,0030	89,3119	0,4369	0,49
6575	0,009	89,7361	0,0081	88,5957	89,1659	0,8064	0,90
7985	0,0097	90,4768	0,0084	89,0030	89,7399	1,0422	1,16

Tabla 24: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4 a pH=6.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Promedio	s	%E
0	0,0088	89,5028	0,0082	88,7348	89,1188	0,5431	0,61
30	0,0103	91,0316	0,0087	89,3822	90,2069	1,1663	1,29
60	0,0086	89,2587	0,0079	88,3070	88,7828	0,6730	0,76
855	0,0097	90,4768	0,0081	88,5957	89,5362	1,3302	1,49
980	0,0085	89,1324	0,0065	85,7885	87,4604	2,3645	2,70
1185	0,0093	90,0672	0,0077	88,0032	89,0352	1,4594	1,64
2339	0,0088	89,5028	0,0079	88,3070	88,9049	0,8456	0,95
2440	0,0094	90,1729	0,0089	89,6208	89,8968	0,3904	0,43
2670	0,0093	90,0672	0,0077	88,0032	89,0352	1,4594	1,64
3746	0,0093	90,0672	0,0075	87,6833	88,8753	1,6857	1,90
4185	0,0093	90,0672	0,0076	87,8454	88,9563	1,5711	1,77
5204	0,0091	89,8489	0,0081	88,5957	89,2223	0,8862	0,99
6575	0,0091	89,8489	0,0086	89,2587	89,5538	0,4173	0,47
7985	0,0089	89,6208	0,0083	88,8705	89,2456	0,5305	0,59

Tabla 25: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4 a pH=7.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Promedio	s	%E
0	0,0095	90,2763	0,0123	92,4898	91,3831	1,5652	1,71
30	0,0104	91,1178	0,0142	93,4947	92,3063	1,6807	1,82
60	0,0094	90,1729	0,0122	92,4283	91,3006	1,5948	1,75
855	0,0101	90,8540	0,0126	92,6687	91,7613	1,2832	1,40
980	0,0100	90,7625	0,0130	92,8942	91,8284	1,5074	1,64
1185	0,0097	90,4768	0,0116	92,0366	91,2567	1,1030	1,21
2339	0,0103	91,0316	0,0124	92,5504	91,7910	1,0740	1,17
2440	0,0094	90,1729	0,0124	92,5504	91,3616	1,6812	1,84
2670	0,0100	90,7625	0,0125	92,6100	91,6863	1,3064	1,42
3746	0,0099	90,6692	0,0125	92,6100	91,6396	1,3724	1,50
4185	0,0108	91,4468	0,0124	92,5504	91,9986	0,7804	0,85
5204	0,0104	91,1178	0,0125	92,6100	91,8639	1,0552	1,15
6575	0,0100	90,7625	0,0125	92,6100	91,6863	1,3064	1,42
7985	0,0100	90,7625	0,0126	92,6687	91,7156	1,3479	1,47

Tabla 26: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4 a pH=8.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Promedio	s	%E
0	0,0093	90,0672	0,0102	90,9436	90,5054	0,6197	0,68
30	0,0099	90,6692	0,0106	91,2854	90,9773	0,4357	0,48
60	0,0093	90,0672	0,0110	91,6023	90,8347	1,0855	1,19
855	0,0096	90,3776	0,0101	90,8540	90,6158	0,3368	0,37
980	0,0088	89,5028	0,0096	90,3776	89,9402	0,6186	0,69
1185	0,0097	90,4768	0,0099	90,6692	90,5730	0,1360	0,15
2339	0,0094	90,1729	0,0095	90,2763	90,2246	0,0731	0,08
2440	0,0093	90,0672	0,0096	90,3776	90,2224	0,2195	0,24

Tabla 27: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4 a pH=9.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Promedio	s	%E
0	0,0134	93,1063	0,0129	92,8391	92,9727	0,1889	0,20
30	0,0156	94,0785	0,0145	93,6293	93,8539	0,3176	0,34
60	0,0143	93,5402	0,0131	92,9485	93,2443	0,4184	0,45
855	0,0136	93,2077	0,0135	93,1574	93,1826	0,0356	0,04
980	0,0143	93,5402	0,0134	93,1063	93,3233	0,3068	0,33
1185	0,0146	93,6729	0,0134	93,1063	93,3896	0,4006	0,43
2339	0,0160	94,2266	0,0141	93,4486	93,8376	0,5501	0,59
2440	0,0157	94,1162	0,0137	93,2573	93,6868	0,6074	0,65
2670	0,0158	94,1535	0,0136	93,2077	93,6806	0,6688	0,71
3746	0,0158	94,1535	0,0145	93,6293	93,8914	0,3706	0,39
4185	0,0159	94,1903	0,0140	93,4018	93,7960	0,5575	0,59
5204	0,0146	93,6729	0,0142	93,4947	93,5838	0,1260	0,13
6575	0,0166	94,4352	0,0155	94,0403	94,2378	0,2792	0,30
7985	0,0155	94,0403	0,0154	94,0016	94,0210	0,0274	0,03

Tabla 28: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4 a pH=10.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Promedio	s	%E
0	0,0115	91,9674	0,0096	90,3776	91,1725	1,1241	1,23
30	0,0124	92,5504	0,0108	91,4468	91,9986	0,7804	0,85
60	0,0121	92,3657	0,0119	92,2374	92,3015	0,0907	0,10
855	0,0422	97,8110	0,0373	97,5235	97,6672	0,2033	0,21
980	0,0478	98,0675	0,0420	97,8006	97,9340	0,1887	0,19
1185	0,0568	98,3737	0,0489	98,1109	98,2423	0,1858	0,19
2339	0,0733	98,7398	0,0618	98,5053	98,6225	0,1658	0,17
2440	0,0723	98,7223	0,0631	98,5361	98,6292	0,1317	0,13
2670	0,0740	98,7517	0,0664	98,6088	98,6802	0,1010	0,10
3746	0,0771	98,8019	0,0691	98,6632	98,7325	0,0981	0,10
4185	0,0768	98,7972	0,0694	98,6689	98,7331	0,0907	0,09
5204	0,0816	98,8680	0,0733	98,7398	98,8039	0,0906	0,09
6575	0,0805	98,8525	0,0728	98,7311	98,7918	0,0858	0,09
7985	0,0785	98,8232	0,0682	98,6455	98,7344	0,1257	0,13
9428	0,0763	98,7893	0,0659	98,5983	98,6938	0,1351	0,14
12278	0,0737	98,7466	0,0581	98,4101	98,5783	0,2380	0,24

Tabla 29: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4 a pH=11.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Promedio	s	%E
0	0,0075	87,6833	0,0105	91,2024	89,4429	2,4883	2,78
30	0,0249	96,2902	0,0278	96,6772	96,4837	0,2736	0,28
60	0,0403	97,7078	0,0425	97,8265	97,7671	0,0839	0,09
855	0,0588	98,4290	0,0688	98,6573	98,5432	0,1615	0,16
980	0,0608	98,4807	0,0685	98,6515	98,5661	0,1208	0,12
1185	0,0622	98,5149	0,0703	98,6860	98,6004	0,1210	0,12
2339	0,0661	98,6025	0,0780	98,8157	98,7091	0,1508	0,15
2440	0,0690	98,6612	0,0768	98,7972	98,7292	0,0961	0,10
2670	0,0698	98,6766	0,0778	98,8127	98,7446	0,0962	0,10
3746	0,0611	98,4881	0,0717	98,7116	98,5999	0,1580	0,16
4185	0,0727	98,7294	0,0815	98,8666	98,7980	0,0970	0,10
5204	0,0745	98,7601	0,0847	98,9094	98,8347	0,1056	0,11
6575	0,0789	98,8292	0,0899	98,9725	98,9008	0,1013	0,10
7985	0,0848	98,9107	0,0945	99,0225	98,9666	0,0791	0,08
9428	0,0847	98,9094	0,0938	99,0152	98,9623	0,0748	0,08
12278	0,0858	98,9234	0,0960	99,0378	98,9806	0,0809	0,08

Tabla 30: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4 a pH=12.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Promedio	s	%E
0	0,0098	90,5740	0,0098	90,5740	90,5740	0,0000	0,00
30	0,0399	97,6848	0,0322	97,1312	97,4080	0,3915	0,40
60	0,0420	97,8006	0,0257	96,4056	97,1031	0,9864	1,02
855	0,0523	98,2337	0,0305	96,9713	97,6025	0,8927	0,91
980	0,0547	98,3112	0,0308	97,0008	97,6560	0,9266	0,95
1185	0,0539	98,2862	0,0319	97,1042	97,6952	0,8358	0,86
2339	0,0579	98,4046	0,0335	97,2425	97,8236	0,8217	0,84
2440	0,0578	98,4018	0,0345	97,3225	97,8621	0,7632	0,78
2670	0,0589	98,4317	0,0340	97,2831	97,8574	0,8122	0,83
3746	0,0611	98,4881	0,0360	97,4340	97,9611	0,7454	0,76
4185	0,0620	98,5101	0,0378	97,5562	98,0331	0,6745	0,69
5204	0,0642	98,5611	0,0375	97,5367	98,0489	0,7244	0,74
6575	0,0695	98,6709	0,0401	97,6964	98,1836	0,6891	0,70
7985	0,0725	98,7259	0,0420	97,8006	98,2632	0,6543	0,67
9428	0,0761	98,7861	0,0434	97,8715	98,3288	0,6467	0,66
12278	0,0761	98,7861	0,0507	98,1780	98,4821	0,4300	0,44

Tabla 31: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4-D a pH=2.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	pH	Promedio	s	%E
0	0,0067	86,2127	0,0068	86,4154	0,0070	86,8036	0,0074	87,5169	0,0095	90,2763	2,00	87,44	1,6592	1,89
120	0,0101	90,8540	0,0109	91,5252	0,0115	91,9674	0,0116	92,0366	0,0162	94,2978	2,00	92,13	1,2970	1,40
1080	0,0100	90,7625	0,0106	91,2854	0,0110	91,6023	0,0113	91,8252	0,0140	93,4018	1,85	91,77	0,9929	1,08
2220	0,0097	90,4768	0,0102	90,9436	0,0107	91,3668	0,0110	91,6023	0,0114	91,8969	1,87	91,25	0,5585	0,61
4500	0,0096	90,3776	0,0113	91,8252	0,0115	91,9674	0,0121	92,3657	0,0142	93,4947	1,93	92,00	1,1216	1,21

Tabla 32: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4-D a pH=3.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	pH	Promedio	s	%E
0	0,0069	86,6123	0,0076	87,8454	0,0082	88,7348	0,0091	89,8489	0,0099	90,6692	3,05	88,74	1,6030	1,80
120	0,0081	88,5957	0,0101	90,8540	0,0105	91,2024	0,0115	91,9674	0,0124	92,5504	3,05	91,03	1,5147	1,66
1080	0,0095	90,2763	0,0097	90,4768	0,0107	91,3668	0,0113	91,8252	0,0127	92,7264	2,98	91,33	1,0043	1,09
2220	0,0105	91,2024	0,0112	91,7522	0,0123	92,4898	0,0127	92,7264	0,0141	93,4486	2,98	92,32	0,8716	0,94
4500	0,0094	90,1729	0,0106	91,2854	0,0108	91,4468	0,0117	92,1047	0,0120	92,3021	2,96	91,46	0,8385	0,91

Tabla 33: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4-D a pH=4.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	pH	Promedio	s	%E
0	0,0071	86,9894	0,0072	87,1701	0,0083	88,8705	0,0088	89,5028	4,00	88,13	1,2457	1,41
120	0,0083	88,8705	0,0088	89,5028	0,0101	90,8540	0,0128	92,7832	3,83	90,50	1,7309	1,91
1080	0,0095	90,2763	0,0097	90,4768	0,0104	91,1178	0,0117	92,1047	3,78	90,99	0,8229	0,90
2220	0,0089	89,6208	0,0102	90,9436	0,0117	92,1047	0,0117	92,1047	3,89	91,19	1,1827	1,29
4500	0,0078	88,1571	0,0085	89,1324	0,0093	90,0672	0,0099	90,6692	3,86	89,50	1,0996	1,22

Tabla 34: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4-D a pH=5.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	pH	Promedio	s	%E
0	0,0068	86,4154	0,0072	87,1701	0,0074	87,5169	0,0077	88,0032	5,05	87,27	0,6680	0,76
120	0,0083	88,8705	0,0084	89,0030	0,0085	89,1324	0,0088	89,5028	5,58	89,12	0,2723	0,30
1080	0,0087	89,3822	0,0094	90,1729	0,0095	90,2763	0,0105	91,2024	5,55	90,25	0,7453	0,82
2220	0,0086	89,2587	0,0091	89,8489	0,0099	90,6692	0,0105	91,2024	5,68	90,24	0,8614	0,95
4500	0,0094	90,1729	0,0106	91,2854	0,0108	91,4468	0,0117	92,1047	2,96	91,46	0,8385	0,91

Tabla 35: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4-D a pH=6.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	pH	Promedio	s	%E
0	0,0065	85,7885	0,0073	87,3459	0,0086	89,2587	0,0094	90,1729	6,02	88,14	1,9617	2,22
120	0,0066	86,0038	0,0071	86,9894	0,0078	88,1571	0,0096	90,3776	6,25	87,88	1,8822	2,14
1080	0,0074	87,5169	0,0082	88,7348	0,0088	89,5028	0,0089	89,6208	6,22	88,84	0,9679	1,08
2220	0,0070	86,8036	0,0074	87,5169	0,0084	89,0030	0,0105	91,2024	6,38	88,63	1,9435	2,19
4500	0,0079	88,3070	0,0080	88,4531	0,0088	89,5028	0,0100	90,7625	6,29	89,25	1,1366	1,27

Tabla 36: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4-D a pH=7.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	pH	Promedio	s	%E
0	0,0069	86,6123	0,0073	87,3459	0,0088	89,5028	0,0093	90,0672	7,07	88,38	1,6635	1,88
120	0,0080	88,4531	0,0100	90,7625	0,0112	91,7522	0,0113	91,8252	6,55	90,69	1,5733	1,73
1080	0,0079	88,3070	0,0079	88,3070	0,0106	91,2854	0,0114	91,8969	6,38	89,94	1,9125	2,12
2220	0,0075	87,6833	0,0099	90,6692	0,0100	90,7625	0,0110	91,6023	6,49	90,17	1,7161	1,90
4500	0,0082	88,7348	0,0086	89,2587	0,0095	90,2763	0,0106	91,2854	6,41	89,88	1,1298	1,25

Tabla 37: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4-D a pH=8.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	pH	Promedio	s	%E
0	0,0075	87,6833	0,0079	88,3070	0,0080	88,4531	0,0080	88,4531	8,00	88,22	0,3671	0,41
120	0,0084	89,0030	0,0088	89,5028	0,0092	89,9592	0,0099	90,6692	6,54	89,78	0,7079	0,78
1080	0,0090	89,7361	0,0091	89,8489	0,0101	90,8540	0,0103	91,0316	6,45	90,36	0,6696	0,74
2220	0,0080	88,4531	0,0087	89,3822	0,0090	89,7361	0,0091	89,8489	6,58	89,35	0,6333	0,70
4500	0,0066	86,0038	0,0086	89,2587	0,0094	90,1729	0,0094	90,1729	6,55	88,90	1,9797	2,22

Tabla 38: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4-D a pH=9.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	pH	Promedio	s	%E
0	0,0071	86,9894	0,0084	89,0030	0,0087	89,3822	0,0090	89,7361	9,01	88,77	1,2292	1,38
120	0,0084	89,0030	0,0098	90,5740	0,0099	90,6692	0,0102	90,9436	6,34	90,29	0,8771	0,97
1080	0,0078	88,1571	0,0098	90,5740	0,0103	91,0316	0,0108	91,4468	6,48	90,30	1,4739	1,63
2220	0,0090	89,7361	0,0093	90,0672	0,0112	91,7522	0,0116	92,0366	6,62	90,89	1,1642	1,28
4500	0,0082	88,7348	0,0086	89,2587	0,0088	89,5028	0,0096	90,3776	6,54	89,46	0,6856	0,76

Tabla 39: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4-D a pH=10.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	pH	Promedio	s	%E
0	0,0072	87,1701	0,0072	87,1701	0,0074	87,5169	0,0100	90,7625	9,99	88,15	1,7461	1,98
120	0,0084	89,0030	0,0092	89,9592	0,0098	90,5740	0,0146	93,6729	9,67	90,80	2,0200	2,22
1080	0,0092	89,9592	0,0094	90,1729	0,0096	90,3776	0,0149	93,8003	6,73	91,07	1,8232	2,00
2220	0,0096	90,3776	0,0103	91,0316	0,0110	91,6023	0,0150	93,8417	6,78	91,71	1,5046	1,64
4500	0,0087	89,3822	0,0097	90,4768	0,0098	90,5740	0,0131	92,9485	6,72	90,84	1,5026	1,65

Tabla 40: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4-D a pH=11.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	pH	Promedio	s	%E
0	0,0063	85,3373	0,0075	87,6833	0,0087	89,3822	0,0095	90,2763	11,03	88,16	2,1731	2,46
120	0,0127	92,7264	0,0127	92,7264	0,0155	94,0403	0,0156	94,0785	10,78	93,39	0,7698	0,82
1080	0,0274	96,6286	0,0296	96,8792	0,0306	96,9812	0,0328	97,1837	10,41	96,91	0,2308	0,23
2220	0,0295	96,8686	0,0303	96,9513	0,0373	97,5235	0,0393	97,6495	7,41	97,24	0,3954	0,40
4500	0,0198	95,3346	0,0272	96,6039	0,0287	96,7814	0,0344	97,3147	6,93	96,50	0,8390	0,86

Tabla 41: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN4-D a pH=12.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	pH	Promedio	s	%E
0	0,0063	85,3373	0,0074	87,5169	0,0077	88,0032	0,0080	88,4531	11,99	87,32	1,3809	1,58
120	0,0395	97,6614	0,0413	97,7633	0,0448	97,9381	0,0490	98,1148	11,93	97,86	0,1995	0,20
1080	0,0486	98,0993	0,0532	98,2636	0,0570	98,3794	0,0572	98,3851	11,94	98,28	0,1340	0,13
2220	0,0483	98,0875	0,0593	98,4422	0,0607	98,4782	0,0623	98,5173	12,06	98,38	0,1983	0,20
4500	0,0377	97,5497	0,0426	97,8316	0,0448	97,9381	0,0606	98,4757	12,12	97,94	0,3876	0,39

Tabla 42: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6 a pH=2.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	Promedio	s	%E
0	0,0083	88,8705	0,0085	89,1324	0,0086	89,2587	0,0086	89,2587	0,0089	89,6208	89,22	0,2707	0,30
60	0,0079	88,3070	0,008	88,4531	0,0084	89,0030	0,0089	89,6208	0,0091	89,8489	89,04	0,6846	0,77
120	0,0078	88,1571	0,0084	89,0030	0,0089	89,6208	0,0091	89,8489	0,0097	90,4768	89,42	0,8818	0,99
1440	-	-	0,0087	89,3822	0,0088	89,5028	0,0088	89,5028	0,0098	90,5740	71,79	-	-
2880	-	-	0,0078	88,1571	0,0092	89,9592	0,0092	89,9592	0,0092	89,9592	71,60	-	-

Tabla 43: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6 a pH=3.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	Promedio	s	%E
0	0,0074	87,5169	0,0084	89,0030	0,0088	89,5028	0,0095	90,2763	0,0099	90,6692	89,39	1,2342	1,38
60	0,0078	88,1571	0,0081	88,5957	0,0083	88,8705	0,0089	89,6208	0,0110	91,6023	89,36	1,3570	1,52
120	0,0080	88,4531	0,0086	89,2587	0,0090	89,7361	0,0093	90,0672	0,0099	90,6692	89,63	0,8374	0,93
1440	0,0081	88,5957	0,0086	89,2587	0,0094	90,1729	0,0094	90,1729	0,0116	92,0366	90,04	1,2960	1,44
2880	0,0082	88,7348	0,0084	89,0030	0,0090	89,7361	0,0094	90,1729	0,0120	92,3021	89,98	1,4136	1,57

Tabla 44: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6 a pH=4.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	Promedio	s	%E
0	0,0070	86,8036	0,0080	88,4531	0,0080	88,4531	0,0089	89,6208	0,0109	91,5252	88,97	1,7450	1,96
60	0,0071	86,9894	0,0077	88,0032	0,0082	88,7348	0,0082	88,7348	0,0089	89,6208	88,41	0,9824	1,11
120	0,0073	87,3459	0,0076	87,8454	0,0076	87,8454	0,0086	89,2587	0,0091	89,8489	88,42	1,0676	1,21
1440	0,0074	87,5169	0,0077	88,0032	0,0079	88,3070	0,0088	89,5028	0,0090	89,7361	88,61	0,9644	1,09
2880	0,0066	86,0038	0,0076	87,8454	0,0078	88,1571	0,0084	89,0030	0,0095	90,2763	88,25	1,5725	1,78

Tabla 45: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6 a pH=5.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	Promedio	s	%E
0	0,0068	86,4154	0,0081	88,5957	0,0081	88,5957	0,0086	89,2587	0,0106	91,2854	88,83	1,7430	1,96
60	0,0071	86,9894	0,0080	88,4531	0,0086	89,2587	0,0088	89,5028	0,0099	90,6692	88,97	1,3642	1,53
120	0,0070	86,8036	0,0077	88,0032	0,0080	88,4531	0,0082	88,7348	0,0083	88,8705	88,17	0,8344	0,95
1440	0,0071	86,9894	0,0076	87,8454	0,0076	87,8454	0,0081	88,5957	0,0083	88,8705	88,02	0,7378	0,84
2880	0,0071	86,9894	0,0076	87,8454	0,0076	87,8454	0,0079	88,3070	0,0092	89,9592	88,18	1,0980	1,25

Tabla 46: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6 a pH=6.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	Promedio	s	%E
0	0,0069	86,6123	0,0072	87,1701	0,0085	89,1324	0,0088	89,5028	0,0092	89,9592	88,47	1,4886	1,68
60	0,0063	85,3373	0,0073	87,3459	0,0080	88,4531	0,0082	88,7348	0,0085	89,1324	87,80	1,5286	1,74
120	0,0076	87,8454	0,0078	88,1571	0,0085	89,1324	0,0086	89,2587	0,0086	89,2587	88,73	0,6767	0,76
1440	0,0060	84,6042	0,0065	85,7885	0,0075	87,6833	0,0076	87,8454	0,0089	89,6208	87,10	1,9493	2,24
2880	0,0066	86,0038	0,0071	86,9894	0,0076	87,8454	0,0077	88,0032	0,0084	89,0030	87,56	1,1299	1,29

Tabla 47: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6 a pH=7.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	Promedio	s	%E
0	0,0074	87,5169	0,0081	88,5957	0,0086	89,2587	0,0091	89,8489	0,0093	90,0672	89,05	1,0336	1,16
60	0,0070	86,8036	0,0074	87,5169	0,0076	87,8454	0,0080	88,4531	0,0090	89,7361	88,07	1,1049	1,25
120	0,0080	88,4531	0,0082	88,7348	0,0083	88,8705	0,0084	89,0030	0,0088	89,5028	88,91	0,3876	0,44
1440	0,0067	86,2127	0,0078	88,1571	0,0089	89,6208	0,0091	89,8489	0,0093	90,0672	88,78	1,6191	1,82
2880	0,0070	86,8036	0,0074	87,5169	0,0088	89,5028	0,0089	89,6208	0,0098	90,5740	88,80	1,5769	1,78

Tabla 48: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6 a pH=8.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	Promedio	s	%E
0	0,0081	88,5957	0,0082	88,7348	0,0086	89,2587	0,0091	89,8489	0,0101	90,8540	89,45	0,9230	1,03
60	0,0070	86,8036	0,0080	88,4531	0,0085	89,1324	0,0085	89,1324	0,0098	90,5740	88,81	1,3668	1,54
120	0,0075	87,6833	0,0080	88,4531	0,0081	88,5957	0,0084	89,0030	0,0091	89,8489	88,71	0,7931	0,89
1440	0,0073	87,3459	0,0075	87,6833	0,0079	88,3070	0,0080	88,4531	0,0096	90,3776	88,43	1,1770	1,33
2880	0,0062	85,1008	0,0077	88,0032	0,0086	89,2587	0,0090	89,7361	0,0094	90,1729	88,45	2,0429	2,31

Tabla 49: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6 a pH=9.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	Promedio	s	%E
0	0,0083	88,8705	0,0086	89,2587	0,0092	89,9592	0,0094	90,1729	0,0096	90,3776	89,72	0,6381	0,71
60	0,0077	88,0032	0,0085	89,1324	0,0090	89,7361	0,0093	90,0672	0,0104	91,1178	89,61	1,1520	1,29
120	0,0078	88,1571	0,0080	88,4531	0,0085	89,1324	0,0089	89,6208	0,0090	89,7361	89,01	0,6986	0,78
1440	0,0077	88,0032	0,0083	88,8705	0,0089	89,6208	0,0091	89,8489	0,0094	90,1729	89,30	0,8706	0,97
2880	0,0081	88,5957	0,0083	88,8705	0,0088	89,5028	0,0088	89,5028	0,0097	90,4768	89,38	0,7259	0,81

Tabla 50: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6 a pH=10.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	Promedio	s	%E
0	0,0088	89,5028	0,0094	90,1729	0,0096	90,3776	0,0096	90,3776	0,0096	90,3776	90,16	0,3788	0,42
60	0,0086	89,2587	0,0087	89,3822	0,0090	89,7361	0,0090	89,7361	0,0092	89,9592	89,61	0,2868	0,32
120	0,0080	88,4531	0,0088	89,5028	0,0088	89,5028	0,0093	90,0672	0,0100	90,7625	89,65	0,8496	0,95
1440	0,0082	88,7348	0,0083	88,8705	0,0089	89,6208	0,0089	89,6208	0,0093	90,0672	89,38	0,5622	0,63
2880	0,0090	89,7361	0,0090	89,7361	0,0091	89,8489	0,0093	90,0672	0,0095	90,2763	89,93	0,2348	0,26
4320	0,0084	89,0030	0,0091	89,8489	0,0091	89,8489	0,0092	89,9592	0,0093	90,0672	89,74	0,4248	0,47
8640	0,0089	89,6208	0,0089	89,6208	0,0094	90,1729	0,0098	90,5740	0,0099	90,6692	90,13	0,5021	0,56
10080	0,0081	88,5957	0,0088	89,5028	0,0092	89,9592	0,0093	90,0672	0,0094	90,1729	89,65	0,6473	0,72
11520	0,0084	89,0030	0,0094	90,1729	0,0096	90,3776	0,0098	90,5740	0,0100	90,7625	90,17	0,6926	0,77

Tabla 51: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6 a pH=11.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	Promedio	s	%E
0	0,0088	89,5028	0,0088	89,5028	0,0090	89,7361	0,0095	90,2763	0,0095	90,2763	89,85	0,3928	0,44
60	0,0086	89,2587	0,0088	89,5028	0,0090	89,7361	0,0093	90,0672	0,0093	90,0672	89,72	0,3539	0,39
120	0,0090	89,7361	0,0098	90,5740	0,0098	90,5740	0,0103	91,0316	0,0105	91,2024	90,62	0,5688	0,63
1440	0,0165	94,4015	0,0167	94,4686	0,0175	94,7214	0,0175	94,7214	0,0195	95,2628	94,71	0,3388	0,36
2880	0,0197	95,3109	0,0222	95,8390	0,0230	95,9837	0,0237	96,1023	0,0265	96,5142	95,95	0,4369	0,46

4320	0,0205	95,4939	0,0226	95,9126	0,0240	96,1510	0,0246	96,2449	0,0262	96,4742	96,05	0,3729	0,39
8640	0,0188	95,0864	0,0197	95,3109	0,0203	95,4495	0,0210	95,6012	0,0224	95,8761	95,46	0,2978	0,31
10080	0,0189	95,1124	0,0193	95,2137	0,0198	95,3346	0,0216	95,7234	0,0235	96,0691	95,49	0,3978	0,42
11520	0,0170	94,5662	0,0172	94,6294	0,0194	95,2384	0,0197	95,3109	0,0219	95,7820	95,10	0,5087	0,53

Tabla 52: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6 a pH=12.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	Promedio	s	%E
0	0,0272	96,6039	0,0088	89,5028	0,0091	89,8489	0,0099	90,6692	0,0103	91,0316	91,53	2,9012	3,17
60	0,0166	94,4352	0,0214	95,6834	0,0216	95,7234	0,0224	95,8761	0,0233	96,0354	95,55	0,6388	0,67
120	0,0247	96,2601	0,0280	96,7009	0,0302	96,9412	0,0303	96,9513	0,0332	97,2176	96,81	0,3597	0,37
1440	0,0259	96,4334	0,0301	96,9311	0,0314	97,0581	0,0347	97,3379	0,0355	97,3979	97,03	0,3862	0,40
2880	0,0275	96,6409	0,0292	96,8365	0,0326	97,1664	0,0371	97,5101	0,0381	97,5755	97,14	0,4088	0,42
4320	0,0267	96,5403	0,0322	97,1312	0,0360	97,4340	0,0378	97,5562	0,0379	97,5627	97,24	0,4310	0,44
8640	0,0264	96,5009	0,0295	96,8686	0,0328	97,1837	0,0355	97,3979	0,0381	97,5755	97,10	0,4284	0,44
10080	0,0286	96,7701	0,0310	97,0202	0,0315	97,0675	0,0368	97,4898	0,0418	97,7901	97,22	0,4072	0,42
11520	0,0274	96,6286	0,0316	97,0767	0,0330	97,2008	0,0395	97,6614	0,0401	97,6964	97,25	0,4436	0,46

Tabla 53: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6-D a pH=2.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	pH	Promedio	s	%E
0	0,0054	82,8935	0,0067	86,2127	0,0067	86,2127	0,0071	86,9894	0,0072	87,1701	2,00	85,57	1,8261	2,13
120	0,0060	84,6042	0,0068	86,4154	0,0072	87,1701	0,0074	87,5169	0,0081	88,5957	2,06	86,42	1,2991	1,50
1080	0,0068	86,4154	0,0077	88,0032	0,0079	88,3070	0,0085	89,1324	0,0091	89,8489	1,97	87,96	1,1376	1,29
2220	0,0062	85,1008	0,0073	87,3459	0,0080	88,4531	0,0080	88,4531	0,0084	89,0030	2,06	87,33	1,5803	1,80
4500	0,0056	83,5045	0,0064	85,5664	0,0076	87,8454	0,0076	87,8454	0,0077	88,0032	2,08	86,19	2,0882	2,42

Tabla 54: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6-D a pH=3.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	pH	Promedio	s	%E
0	0,0059	84,3432	0,0059	84,3432	0,0063	85,3373	0,0064	85,5664	0,0072	87,1701	3,05	84,89	0,6469	0,76
120	0,0067	86,2127	0,0071	86,9894	0,0075	87,6833	0,0081	88,5957	0,0082	88,7348	3,14	87,37	1,0140	1,160
1080	0,0063	85,3373	0,0065	85,7885	0,0066	86,0038	0,0078	88,1571	0,0081	88,5957	3,08	86,32	1,2547	1,45
2220	0,0072	87,1701	0,0074	87,5169	0,0074	87,5169	0,0076	87,8454	0,0084	89,0030	3,01	87,51	0,2757	0,315
4500	0,0057	83,7939	0,0062	85,1008	0,0067	86,2127	0,0075	87,6833	0,0079	88,3070	3,00	85,69	1,6522	1,92

Tabla 55: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6-D a pH=4.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	pH	Promedio	s	%E
0	0,0060	84,6042	0,0063	85,3373	0,0074	87,5169	0,0077	88,0032	0,0116	92,0366	4,00	86,36	1,6500	1,91
120	0,0070	86,8036	0,0074	87,5169	0,0082	88,7348	0,0089	89,6208	0,0133	93,0545	3,96	88,16	1,2540	1,42
1080	0,0064	85,5664	0,0067	86,2127	0,0076	87,8454	0,0086	89,2587	0,0126	92,6687	3,95	87,22	1,6630	1,90
2220	0,0074	87,5169	0,0075	87,6833	0,0080	88,4531	0,0084	89,0030	0,0124	92,5504	3,92	88,16	0,6922	0,78
4500	0,0066	86,0038	0,0073	87,3459	0,0080	88,4531	0,0088	89,5028	0,0129	92,8391	3,96	87,82	1,5007	1,70

Tabla 56: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6-D a pH=5.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	pH	Promedio	s	%E
0	0,0057	83,7939	0,0068	86,4154	0,0074	87,5169	0,0076	87,8454	0,0088	89,5028	5,05	86,39	1,8374	2,12
120	0,0056	83,5045	0,0071	86,9894	0,0078	88,1571	0,0086	89,2587	0,0091	89,8489	6,56	86,97	2,4938	2,86
1080	0,0062	85,1008	0,0072	87,1701	0,0082	88,7348	0,0085	89,1324	0,0093	90,0672	5,49	87,53	1,8302	2,09
2220	0,0064	85,5664	0,0072	87,1701	0,0086	89,2587	0,0009	89,7361	0,0098	90,5740	5,64	87,93	1,9314	2,19
4500	0,0065	85,7885	0,0070	86,8036	0,0080	88,4531	0,0085	89,1324	0,0097	90,4768	5,57	87,54	1,5253	1,74

Tabla 57: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6-D a pH=6.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	pH	Promedio	s	%E
0	0,0061	84,8566	0,0064	85,5664	0,0070	86,8036	0,0073	87,3459	0,0073	87,3459	6,02	86,14	1,1359	1,31
120	0,0072	87,1701	0,0078	88,1571	0,0080	88,4531	0,0080	88,4531	0,0084	89,0030	6,65	88,05	0,6084	0,69
1080	0,0078	88,1571	0,0078	88,1571	0,0079	88,3070	0,0080	88,4531	0,0092	89,9592	6,31	88,26	0,1419	0,16
2220	0,0071	86,9894	0,0073	87,3459	0,0074	87,5169	0,0081	88,5957	0,0083	88,8705	6,36	87,61	0,6916	0,78
4500	0,0066	86,0038	0,0074	87,5169	0,0075	87,6833	0,0075	87,6833	0,0090	89,7361	6,30	87,22	0,8158	0,93

Tabla 58: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6-D a pH=7.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	pH	Promedio	s	%E
0	0,0062	85,1008	0,0067	86,2127	0,0069	86,6123	0,0071	86,9894	0,0073	87,3459	7,07	86,22	0,8161	0,94
120	0,0066	86,0038	0,0070	86,8036	0,0074	87,5169	0,0078	88,1571	0,0094	90,1729	6,74	87,12	0,9272	1,06
1080	0,0056	83,5045	0,0074	87,5169	0,0078	88,1571	0,0079	88,3070	0,0083	88,8705	6,40	86,87	2,2706	2,61
2220	0,0072	87,1701	0,0075	87,6833	0,0075	87,6833	0,0078	88,1571	0,0083	88,8705	6,60	87,67	0,4031	0,45
4500	0,0073	87,3459	0,0078	88,1571	0,0079	88,3070	0,0081	88,5957	0,0082	88,7348	6,51	88,10	0,5356	0,60

Tabla 59: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6-D a pH=8.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	pH	Promedio	s	%E
0	0,0059	84,3432	0,0067	86,2127	0,0071	86,9894	0,0072	87,1701	0,0076	87,8454	8,00	86,17	1,2923	1,49
120	0,0064	85,5664	0,0068	86,4154	0,0078	88,1571	0,0080	88,4531	0,0081	88,5957	6,75	87,14	1,3856	1,58
1080	0,0049	81,1480	0,0075	87,6833	0,0077	88,0032	0,0078	88,1571	0,0084	89,0030	6,43	86,24	3,4057	3,94
2220	0,0070	86,8036	0,0070	86,8036	0,0076	87,8454	0,0080	88,4531	0,0084	89,0030	6,26	87,47	0,8156	0,93
4500	0,0065	85,7885	0,0067	86,2127	0,0074	87,5169	0,0074	87,5169	0,0078	88,1571	6,56	86,75	0,8924	1,02

Tabla 60: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6-D a pH=9.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	pH	Promedio	s	%E
0	0,0059	84,3432	0,0066	86,0038	0,0068	86,4154	0,0069	86,6123	0,0071	86,9894	9,01	85,84	1,0319	1,20
120	0,0073	87,3459	0,0073	87,3459	0,0078	88,1571	0,0800	98,8453	0,0084	89,0030	6,81	90,42	5,6275	6,22
1080	0,0069	86,6123	0,0073	87,3459	0,0079	88,3070	0,0079	88,3070	0,0087	89,3822	7,26	87,64	0,8231	0,93
2220	0,0072	87,1701	0,0076	87,8454	0,0076	87,8454	0,0082	88,7348	0,0083	88,8705	6,62	87,89	0,6417	0,73
4500	0,0066	86,0038	0,0076	87,8454	0,0077	88,0032	0,0078	88,1571	0,0083	88,8705	6,61	87,50	1,0071	1,15

Tabla 61: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6-D a pH=10.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	pH	Promedio	s	%E
0	0,0059	84,3432	0,0061	84,8566	0,0067	86,2127	0,0072	87,1701	0,0081	88,5957	9,99	85,64	1,2864	1,50
120	0,0076	87,8454	0,0089	89,6208	0,0092	89,9592	0,0093	90,0672	0,0100	90,7625	10,05	89,37	1,0361	1,15
1080	0,0095	90,2763	0,0104	91,1178	0,0112	91,7522	0,0115	91,9674	0,0122	92,4283	8,51	91,27	0,7592	0,83
2220	0,0092	89,9592	0,0101	90,8540	0,0108	91,4468	0,0118	92,1716	0,0120	92,3021	6,89	91,10	0,9363	1,02
4500	0,0077	88,0032	0,0080	88,4531	0,0103	91,0316	0,0110	91,6023	0,0122	92,4283	6,84	89,77	1,8078	2,01

Tabla 62: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6-D a pH=11.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	pH	Promedio	s	%E
0	0,0053	82,5708	0,0060	84,6042	0,0062	85,1008	0,0062	85,1008	0,0070	86,8036	11,03	84,34	1,2052	1,42
120	0,0085	89,1324	0,0092	89,9592	0,0093	90,0672	0,0096	90,3776	0,0108	91,4468	10,93	89,88	0,5316	0,59
1080	0,0165	94,4015	0,0172	94,6294	0,0178	94,8104	0,0180	94,8681	0,0192	95,1888	10,54	94,67	0,2101	0,22
2220	0,0140	93,4018	0,0173	94,6604	0,0181	94,8964	0,0184	94,9796	0,0242	96,1829	10,15	94,48	0,7344	0,77
4500	0,0123	92,4898	0,0158	94,1535	0,0164	94,3674	0,0177	94,7811	0,0199	95,3580	6,96	93,94	1,0064	1,07

Tabla 63: Datos obtenidos para el hinchamiento de hidrogeles de CAS13/GEN6-D a pH=12.

Tiempo (min)	Masa 1 (g)	%A ₁	Masa 2 (g)	%A ₂	Masa 3 (g)	%A ₃	Masa 4 (g)	%A ₄	Masa 5 (g)	%A ₅	pH	Promedio	s	%E
0	0,0055	83,2045	0,0057	83,7939	0,0063	85,3373	0,0067	86,2127	0,0073	87,3459	11,99	84,63	1,3828	1,63
120	0,0208	95,5589	0,0234	96,0524	0,0236	96,0858	0,0251	96,3197	0,0259	96,4334	12,01	96,00	0,3198	0,33
1080	0,0232	96,0183	0,0265	96,5142	0,0265	96,5142	0,0285	96,7588	0,0329	97,1922	11,99	96,45	0,3109	0,32
2220	0,0217	95,7431	0,0227	95,9306	0,0232	96,0183	0,0251	96,3197	0,0287	96,7814	12,14	96,00	0,2404	0,25
4500	0,0251	96,3197	0,0276	96,6531	0,0277	96,6652	0,0283	96,7359	0,0288	96,7925	12,12	96,59	0,1861	0,19

www.bdigital.ula.ve