

SÍNTESIS DE DERIVADOS DE 1, 2, 3 TRIAZOL-QUITOSANO A PARTIR DE REACCIONES DE QUÍMICA CLICK Y DESARROLLO DE PELÍCULAS ACTIVAS

SYNTHESIS OF 1, 2, 3 TRIAZOLE-CHITOSAN DERIVATIVES FROM CLICK CHEMISTRY REACTIONS AND ACTIVE FILM DEVELOPMENT

Alisson Pozo-Llumiquire¹, Sebastián Serrano-León¹, Pablo Bonilla-Valladares¹, Rommy Teran-Soto¹, Monserrat Naranjo-López¹, Alejandro Osorio-Quiroz¹, Trosky Yáñez-Darquea¹, José-Iván Chango², Luis Carrión-Matamoros³, Carlota Moreno-Guerrero⁴ & Christian Alcívar-León^{1*}

Recibido: 03 de julio 2024 / Aceptado: 06 de enero 2025
DOI: 10.26807/ia.v13i1.289

Palabras clave: actividad antimicrobiana, cicloadición azida-alquino, DSC, quitosano, resistencia a la tracción, rugosidad.

Keywords: antimicrobial activity, Azide-Alkyne Cycloaddition, Chitosan, DSC, roughness, tensile strength

¹ Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas, Quito, Ecuador. (alissoneyadirita@hotmail.com; jserranol@uce.edu.ec; pmbonilla@uce.edu.ec; riteran@uce.edu.ec; cmnaranjo@uce.edu.ec; alejandroosorio83@gmail.com; tgyanez@uce.edu.ec; *correspondencia: cdalcivar@uce.edu.ec)

² Escuela Politécnica Nacional, Centro de Investigaciones Aplicadas a Polímeros, Quito, Ecuador. (jose.chango@epn.edu.ec)

³ Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, DCEM, Sangolquí, Ecuador. (lmcarrion1@espe.edu.ec)

⁴ Universidad UTE, Facultad de Ciencias de la Ingeniería e Industrias, Quito, Ecuador. (cmoreno@ute.edu.ec)

RESUMEN

El uso masivo de empaques alimenticios, y la ineficiencia de procesos de reciclaje han despertado el interés en la búsqueda de macromoléculas derivadas de fuentes naturales como reemplazo de los plásticos actuales. En este sentido, se desarrolló la síntesis de derivados de quitosano a partir de reacciones de “Química click”, utilizando quitosano extraído de exoesqueletos de camarón. Los derivados de 1, 2, 3 triazol-quitosano se obtuvieron mediante reacciones de cicloadición azida-alquino asistidas por ultrasonido sobre una matriz de quitosano de peso molecular medio de 453 kDa, y un grado de desacetilación mayor al 90 %. Se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. typhimurium* en concentraciones de 1 % y 2 %, se observó actividad antimicrobiana de todos los derivados, con halos de inhibición iguales o superiores a gentamicina. Asimismo, se desarrollaron películas de cada derivado utilizando PVA como plastificante. La resistencia a la tracción de las películas estuvo entre 42 MPa y 68 MPa, siendo mayores al valor obtenido para un plástico de empaque común, 41 MPa. Los ensayos de DSC evidenciaron la estabilidad térmica del quitosano y sus derivados, y permitieron determinar sus temperaturas de transición vítrea. Se realizaron medidas de AFM de las películas, la rugosidad mostró micro superficies homogéneas. Por lo tanto, las películas con derivados de 1, 2, 3 triazol-quitosano presentaron características mecánicas mejoradas, actividad antimicrobiana, temperaturas elevadas de transición vítrea y rugosidad uniforme a nivel micrométrico, características que le brindan potencial aplicación para el desarrollo de empaques alimenticios.

ABSTRACT

The massive and uncontrolled use of food packaging and the inefficiency of recycling processes have awakened interest in the search for macromolecules derived from natural sources as a replacement for current plastics. In this sense, the synthesis of chitosan derivatives was developed from Click Chemistry reactions, using chitosan extracted from shrimp exoskeletons. The 1, 2, 3 triazole-chitosan derivatives were obtained by ultrasound-assisted azide-alkyne cycloaddition reactions on a chitosan matrix with an average molecular weight of 453 kDa, and a degree of deacetylation greater than 90%. Antimicrobial activity assays were performed using the chitosan derivatives obtained against

S. aureus, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. typhimurium* at concentrations of 1% and 2%, and good antimicrobial activity was observed for all the derivatives, with inhibition halos equal or higher than gentamicin. Films of each derivative were also developed using PVA as plasticizer. The tensile strength of the films ranged from 42 MPa to 68 MPa, which was higher than the value obtained for a common packaging plastic, 41 MPa. DSC tests evidenced the thermal stability of the extracted chitosan and its derivatives and allowed determining their glass transition temperatures. AFM measurements of the films were performed, and the roughness shows homogeneous micro surfaces. Therefore, films developed with 1, 2, 3 triazole-chitosan derivatives exhibit improved mechanical characteristics, antimicrobial activity, elevated glass transition temperatures and uniform micrometer-level roughness that provide potential application for the development of food packaging.

INTRODUCCIÓN

La dependencia que existe hacia productos plásticos ha aumentado debido a su versatilidad y durabilidad. La variedad de polímeros disponibles y sus numerosos aditivos dan como resultado, diversos materiales que pueden adaptarse a varias aplicaciones generando una amplia dependencia sobre todos los productos derivados (Welden, 2020). En la actualidad, la mayoría de los desechos plásticos proviene de los plásticos de un solo uso y representan una gran fuente de contaminación. Considerando

que durante sus procesos de elaboración, uso y desecho de los productos plásticos se pueden emitir diversas sustancias nocivas al medio ambiente, entre las que se incluyen retardadores de llama bromados, ftalatos, bisfenoles A, dimetacrilato de bisfenol-A, cadmio, estaño, plomo, acetaldehído y formaldehído, benceno, y muchos otros compuestos orgánicos volátiles, y la alta capacidad de adsorción de varios de estos contaminantes sobre la superficie de los plásticos desechados (Singh et al., 2021). La

bioacumulación de microplástico por parte de varios peces y su transporte a través de la cadena trófica, implicaría futuros efectos nocivos para los seres vivos (Sunitha et al., 2021). Por lo tanto, los desechos plásticos no representan solamente una fuente importante de contaminación, sino un medio de transporte de varios productos tóxicos. Los efectos solo aumentan al considerar la cantidad de tiempo que permanecen disponibles estos desechos debido a su resistencia a la degradación.

La necesidad de materiales de empaque ecológico crece con la actual preocupación por los futuros impactos medioambientales. Aunque los materiales plásticos poliméricos para empaques presentan flexibilidad de moldeo y una buena resistencia a factores mecánicos y ambientales suponen un aumento en la contaminación por plásticos debido al consumo masivo de alimentos. Por lo que, el uso de biopolímeros que incluyen proteínas, lípidos o polisacáridos, como bases materiales para empaques biodegradables

resultan una solución ideal ya que se descomponen en un período corto y no son tóxicos (Bhargava et al., 2020). El reto dentro de esta área se encuentra en mejorar la vida útil de los productos alimenticios y las características de los empaques con un mínimo impacto negativo sobre el medio ambiente.

El quitosano es un biopolímero abundante que posee actividad antimicrobiana contra una gran cantidad de microorganismos, incluidos hongos y bacterias grampositivas/gramnegativas. Además, tanto el quitosano como sus derivados poseen una buena capacidad de captación de radicales libres para prevenir el daño oxidativo al terminar una reacción en cadena de los radicales libres durante el proceso de oxidación. De igual forma, la fácil hidrólisis por enzimas de los enlaces en su estructura lo resaltan como una matriz con gran potencial para empaques biodegradables (Arshad et al., 2020).

Ya que el quitosano posee grupos

amino muy reactivos que admiten modificaciones químicas simples y muy útiles en su estructura lo cual se ve favorecido cuando las reacciones permiten utilizar solventes benignos, condiciones de reacción sencillas y métodos de purificación no cromatográficos (Hein et al., 2008). Un ejemplo son las reacciones de la “Química click” que abarcan reacciones estereoespecíficas que dan productos con altos rendimientos y con subproductos fácilmente removibles (Xi et al., 2014).

Existen varias investigaciones que aprovechan las ventajas de las reacciones de cicloadición azida-alquino en la matriz de quitosano con el fin de obtener productos de mayor valor. Por ejemplo, aumento de la actividad antifúngica, antimicrobiana (Tan et al., 2018; Tan et al., 2020), y biológica (Tan et al., 2016). Así mismo, los productos como películas compactas y uniformes desarrolladas a partir de diferentes fragmentos estructurales de triazoles en la cadena polimérica de quitosano presentaron buena resistencia

a la tracción y permeabilidad al vapor de agua (Kritchenkov et al., 2020). O mejoraron sus propiedades de rotura por alargamiento, estabilidad térmica y actividad antimicrobiana (Aboelnaga et al., 2017). De igual forma, la combinación de técnicas y metodologías potentes han permitido aumentar el carácter verde y sostenible de las reacciones de cicloadición azida-alquino (Kritchenkov et al., 2019). Por lo tanto, la cicloadición de azida-alquino catalizada por Cu(I) (CuAAC) se presenta como una herramienta fundamental para el diseño de nuevas arquitecturas poliméricas bien definidas sintetizadas con un excelente control de la masa molecular y grupos funcionales bien definidos, facilitándose así el diseño de polímeros ramificados regulares termodinámica y cinéticamente estables que sirvan como biomateriales con amplias aplicaciones (Chauhan et al., 2019). Además, el uso de desechos de camarón para la extracción de quitina y obtención de diferentes tipos de quitosano funcionalizado

puede proporcionar una forma de minimizar los peligros ambientales al tiempo que se facilita la adición de valor a los empaques.

En vista que, la viabilidad de elaboración de empaques a base de quitosano es ampliamente

conocida, este estudio evalúa las propiedades mecánicas, térmicas y de superficie de las películas a partir de reacciones de “Química click”, donde se adicionaron restos estructurales de triazol a la cadena polimérica del quitosano que poseen actividad antimicrobiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de quitina

Para la obtención de quitina se lavó con abundante agua desechos de exoesqueletos de camarón, se retiraron las cabezas, patas y colas, quedando solamente el caparazón. Finalmente, se secaron a temperatura ambiente durante una semana y se homogenizó la muestra en un molino SM300 hasta disminuir el tamaño de partícula a 80 μm .

Desmineralización

El proceso de desmineralización empezó con 120 gramos del producto de molienda en una solución de 2 N de HCl utilizando una relación 1:5 (p/v) y se agitó constantemente la suspensión

formada durante 2 h a temperatura ambiente. El producto obtenido se lavó agitando y centrifugando varias veces con agua destilada controlando que las aguas de lavado lleguen a un pH neutro. Se secó el producto en una estufa a 65 °C durante 24 h. Finalmente, se homogenizó la muestra triturando el sólido (Malar et al., 2021).

Desproteínización

El producto de desmineralización se colocó en una solución de NaOH 2 mol/L utilizando una relación 1:10 (p/v) y se agitó constantemente la suspensión a 100 °C durante 3 h. El producto obtenido se lavó agitando y centrifugando varias veces con agua destilada controlando que las aguas de

lavado lleguen a un pH neutro. Se secó el producto en una estufa a 65 °C durante 24 h. Finalmente, se homogenizó la muestra triturando el sólido (Malar et al., 2021).

Desacetilación de quitina

La obtención de quitosano comenzó con el reflujo del producto de la desproteínización con una solución de NaOH al 50 % en una relación 1:10 (p/v) a 120 °C durante 22 h. El producto obtenido se lavó agitando y centrifugando varias veces con agua destilada controlando que las aguas de lavado lleguen a un pH neutro. Se secó el producto en una estufa a 65 °C durante 24 h. Finalmente, se homogenizó la muestra triturando el sólido (De Queiroz et al., 2017).

Caracterización de quitosano

Se caracterizó el quitosano a partir del grado de desacetilación por espectroscopía infrarroja FTIR y titulación potenciométrica, y el peso molecular por viscosimetría capilar.

Grado de desacetilación

El grado de desacetilación se

determinó por FTIR y titulación potenciométrica. Los espectros FTIR se midieron en un espectrómetro infrarrojo JASCO modelo FT/IR-4600, con una resolución de 2 cm⁻¹ y 64 barridos, en un rango espectral de 400 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹. Las muestras secas se molieron con KBr en una relación de muestra 1:10 (m/m) y se formó una pastilla con el polvo en una prensa automática (de Queiroz et al., 2017).

$$DD (\%) = 100 - \frac{\left[\left(\frac{A_{1320}}{A_{1420}} \right) - 0,3822 \right]}{0,03133} \quad 1$$

Para la titulación potenciométrica se disolvieron 0,05 g de quitosano en 10 mL de una solución 0,1 M de HCl valorado. Se tituló la mezcla con una solución 0,1 M de NaOH valorado y se midió el cambio de pH con un potenciómetro marca HORIBA Scientific modelo LACUA pH1200 cada 0,1 mL añadidos de NaOH mientras se mantuvo la agitación constante hasta 5 mL después de llegar al punto de equivalencia. Finalmente, se construyó una curva de titulación de pH vs volumen de NaOH añadido en mL. Para conocer

el grado de desacetilación se determinó el contenido de amina de la muestra con la siguiente ecuación:

$$NH_2\% = 16,1 \left(\frac{(Y - X)}{M} \right) * C_{NaOH} \quad 2$$

Donde X (mL) es el primer punto de inflexión en la gráfica de pH medido vs el volumen de titulación, Y (mL) es el segundo punto de inflexión, C_{NaOH} (mol/L) es la concentración de la solución de NaOH y M (g) es el peso de quitosano utilizado (Sivashankari & Prabakaran, 2017).

Peso molecular

Para determinar el peso molecular se utilizó un termostato marca Huber modelo CC-130A Visco con capacidad reguladora de temperatura de $\pm 0,01$ °C y un viscosímetro de Ostwald. Se preparó una solución madre de quitosano de 0,01 g/mL en 1 % de ácido acético y a partir de ésta variassolucionesdeconcentración: 0,0005; 0,001; 0,002; 0,003 y 0,004 g/mL. Se sumergió el viscosímetro de Ostwald en el baño térmico a 25 °C con 15 mL de

la solución a analizar. Se realizaron mediciones del tiempo que tarda cada concentración en pasar a través del tubo capilar. Se repitió este procedimiento para cada solución y el solvente. Además, se determinó la densidad relativa a 25 °C de cada solución utilizando el método del picnómetro.

Midiendo el tiempo de elución t de la solución de polímero a diferentes concentraciones y el tiempo de elución t_0 del solvente puro se definieron las siguientes viscosidades relativa, reducida, inherente e intrínseca. Finalmente, el se determinó aplicando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada.

$$[\eta] = K(\overline{M}_v)^a \quad 3$$

Donde $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca, K es igual a 0,00016 y a es 0,79 para el sistema quitosano-ácido acético (Chandrasekharan et al., 2019).

Síntesis de 1-cloro-2-hidroxi-3-azido propano

Se añadió 0,2 g de bromuro de

hexadeciltrimetilamonio en 40 mL de agua y se agregó 16 g de azida de sodio, la mezcla se agitó hasta su disolución. Luego, se añadieron 20 mL de epiclorhidrina y se agitó durante 24 h a 25 °C. El producto se lavó 5 veces con éter dietílico, se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró. Finalmente, se almacenó la solución en un frasco ámbar (Kritchenkov et al., 2019).

Síntesis de derivado azidado de quitosano

Se pesó 2 g de quitosano y se disolvió en 100 mL de una solución de HCl al 5% y ácido acético 5% en una proporción 1:10 (v/v). Se añadieron 9,3 mL de 1-cloro-2-hidroxi-3-azido propano y se dejó agitar el sistema por 24 h a temperatura ambiente. Se agregó gota a gota una solución de amoniaco en metanol al 40 % (v/v) hasta la formación de un sólido blanco. El sólido se lavó 3 veces con metanol, una con agua y otra con éter dietílico (Ryu et al., 2013). Finalmente, se dejó secar a 45 °C en una estufa por 24 h y se homogenizó la muestra

triturando el sólido.

Síntesis de derivados de 1, 2, 3 triazol-QUITOSANO

Se disolvió 0,8 g de quitosano azidado en 20 ml de ácido acético 1 % y se agitó hasta obtener una solución homogénea. Se preparó soluciones de 4,6 mg de $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ con 0,1 mL de trietanolamina y 3,8 mg de ascorbato de sodio en 1,5 mL de agua. Luego, se disolvió 30 μL de alquino correspondiente en 10 mL de cloroformo. Se mezclaron todas las disoluciones en un recipiente de vidrio y se colocaron en ultrasonido durante 15 min (Kritchenkov et al., 2019). Los derivados de 1, 2, 3 triazol-QUITOSANO precipitaron mediante la adición gota a gota de una disolución al 40 % de amoniaco en metanol. Se lavó el sólido resultante varias veces con metanol, una vez con agua y otra con acetona. Finalmente, se secó a 45 °C en una estufa durante 48 h.

Caracterización de derivados de 1, 2, 3 triazol-quitosano

Cálculos computacionales

Los cálculos de optimizaciones de geometría, espectros IR y espectros UV-Vis de los monómeros diseñados de cada derivado de 1, 2, 3 triazol-quitosano se realizaron con el software Gaussian 09. Se utilizó el método teórico DFT, con el nivel funcional B3LYP utilizando el conjunto base 6-31G (d,p) (Del Bene et. Al., 1995).

Caracterización de derivados de 1, 2, 3 triazol-quitosano

Se midieron espectros FTIR en un espectrómetro infrarrojo JASCO modelo FT/IR-4600 equipado con reflectancia total atenuada (ATR), a una resolución de 4 cm^{-1} y 64 barridos, en un rango espectral de 650 a 4000 cm^{-1} . De igual forma, se midieron espectros UV-Vis en espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary50 de soluciones de quitosano y los derivados en 1 % en ácido acético. La información fue registrada en modo de absorbancia entre las longitudes de onda de 200 a 800 nm .

Determinación de actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se determinó mediante el método de difusión en pocillo, se evaluaron las soluciones de derivados de 1, 2, 3 triazol-quitosano al 1 y 2 % en ácido acético al 1 %. Para la prueba antibacteriana, todas las soluciones se probaron in vitro contra *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. typhimurium*. Se utilizaron controles positivos (gentamicina y ampicilina) y un control negativo (solución de ácido acético). Las bacterias se activaron en un medio de cultivo nutritivo, tripticasa soya agar, se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Se realizó una suspensión bacteriana con cada una de las cepas activadas en solución salina estéril al 0,85 %, a una concentración de 0,5 McFarland. Para evaluar la actividad antimicrobiana se utilizó el agar Mueller Hinton, con ayuda de un hisopo empapado de la solución bacteriana se estrío el agar cubriendo su superficie por completo, este procedimiento se lo realizó para cada una de las

bacterias seleccionadas. Una vez estriados los agares se realizaron pozos de 5 mm de diámetro con un sacabocados donde se colocaron 25 μ L de cada solución de los derivados. Se incubaron las placas a 37 ° C durante 24 h. (Shah et al., 2018). Se realizaron dos repeticiones.

Formación de películas con derivados de 1,2,3 triazol quitosano

Se desarrollaron películas mediante el método de fundición en solución a partir de soluciones de 2 % de quitosano y de los derivados de 1, 2, 3 triazol-quitosano en ácido acético al 1% y 5 % de PVA en agua. Se combinaron las soluciones en una relación 1:1 (v/v) en vasos de precipitación y se agitaron durante 30 min a 30 °C. Las soluciones resultantes se colocaron en un baño de ultrasonido durante 45 min y se transfirieron 15 mL de cada mezcla a cajas Petri de vidrio. Se dejó secar a 50 °C por 24 h. Finalmente, se despegaron las películas secas de sus placas.

Caracterización de películas con derivados de 1,2,3 triazol quitosano

Propiedades mecánicas

La resistencia a la tracción y porcentaje de elongación a la rotura de las películas se midió utilizando una máquina de vigas universales de marca TecQuipment modelo SM 104. La separación de agarre inicial se fijó a 29 mm aproximadamente y una velocidad de la cruceta de 5 mm/min. La prueba se llevó a cabo sobre tiras de película de 40 mm de longitud y 10 mm de ancho, Se realizaron tres repeticiones de la prueba mecánica a temperatura ambiente y se repitió 3 veces cada ensayo.

Calorimetría diferencial de barrido

Las propiedades endotérmicas y exotérmicas de las películas se midieron en un equipo de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de marca TA Instruments modelo Q2000 en un rango de temperatura de 50 a 450 °C con una rampa de calentamiento de 10 °C.min⁻¹. Se pesó 5 mg de cada derivado 1, 2, 3 triazol-quitosano y de cada película formada, y se

colocaron en copas de aluminio para luego sellarlas.

Análisis topográfico con Microscopía de fuerza atómica

La rugosidad y la topografía de las películas se determinó en un microscopio de fuerza atómica (AFM) de marca Park system modelo NX10. Se programó el equipo en modo contacto, con una velocidad de barrido de 0,50 Hz y con un set pint de 100 nN. Se cortaron porciones de 0,6 cm x 0,6

cm de cada película y se realizó un mapeo de la superficie. Se procedió a repetir dos veces el ensayo.

Diseño experimental

En el análisis estadístico se empleó el paquete informático estadístico SPSS. Se aplicó un diseño estadístico factorial $A \times B \times C$, con un 95 % de confianza. Además, para establecer la diferencia significativa entre las medias de los tratamientos se realizó la prueba de Duncan.

RESULTADOS

Obtención de quitosano

Se obtuvo un porcentaje de rendimiento del 22,2 %, el cual se calculó a partir de la cantidad de biomasa inicial.

Caracterización de quitosano

El análisis FTIR del quitosano obtenido se presenta en la Figura 1. Donde se revela una banda fuerte alrededor de 3435 cm^{-1} que se atribuye al estiramiento del enlace OH de los grupos hidroxilos superpuesto al estiramiento del enlace NH_2 de los grupos amina

y a la formación de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares en los que están involucrados estos enlaces (Weißpflog et al., 2021). Las bandas de absorción alrededor de 2957 y 2886 cm^{-1} se pueden designar al estiramiento simétrico y asimétrico $\text{C}_{\text{sp}3}\text{-H}$ de los grupos metilenos, respectivamente.

Se confirma la presencia de grupos N-acetilo residuales por las bandas alrededor de 1657 cm^{-1} (estiramiento C=O de la amida) y 1323 cm^{-1} (estiramiento C-N de amida), respectivamente. No se

encontró la banda en 1550 cm^{-1} que corresponde a la flexión N-H de la amida, la cual fue probablemente superpuesta por otras bandas. Una banda a 1589 cm^{-1} corresponde a la flexión N-H de la amina primaria.

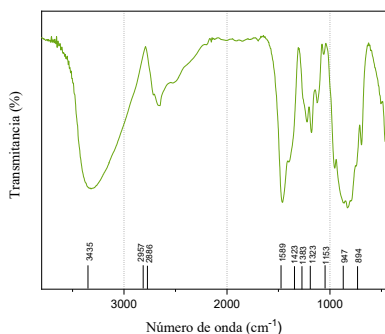
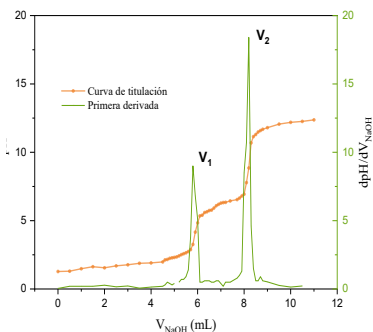


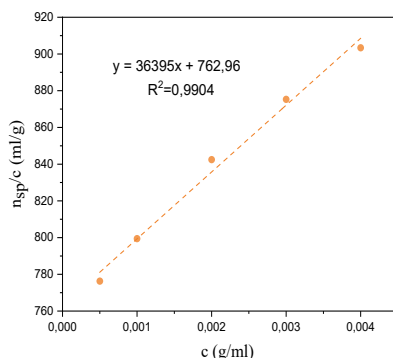
Figura 1. Espectro FTIR de quitosano

La flexión de CH_2 y el estiramiento simétrico de CH_3 fueron confirmadas por la presencia de bandas alrededor de 1423 y 1383 cm^{-1} , respectivamente. La banda de absorción a 1153 cm^{-1} se puede atribuir al estiramiento asimétrico del puente C-O-C. Las bandas de 1097 y 1036 cm^{-1} corresponden al estiramiento C-O en diferentes tipos de enlaces C-OH, C-O-C y $\text{CH}_2\text{-OH}$. La banda en 894 cm^{-1} corresponde a la vibración del enlace β - glucosídico (Negrea et al., 2015).

El grado de desacetilación (DD), calculado fue de $92,96\%$, aplicando la ecuación 1. El DD también fue confirmado mediante valoración potenciométrica, como se indica en la Figura 2, cuyo valor de DD fue $92,96\%$.



(a)



(b)

Figura2. Curva de titulación potenciométrica de quitosano al 0,5% en HCl (a), viscosidad intrínseca del quitosano (b)

El peso molecular de quitosano se determinó extrapolando la viscosidad reducida de diferentes concentraciones de soluciones de quitosano a concentración cero para obtener la viscosidad intrínseca del quitosano (Figura 2). Ya que la viscosidad intrínseca describe la capacidad de un polímero para formar soluciones viscosas y es directamente proporcional al peso molecular promedio del polímero a través de la ecuación 3, el peso molecular del quitosano extraído fue de 45308 g/mol o 453,1 kDa (Gonçalves et al., 2021).

Síntesis de derivados de 1, 2, 3 triazol-quitosano

La síntesis de N-(3-azido-2-hidroxipropil) quitosano fue confirmada por la presencia de la banda característica de vibraciones de estiramiento del grupo azida en el espectro FTIR a 2101 cm^{-1} (Figura 3).

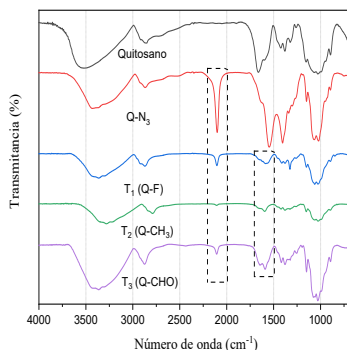
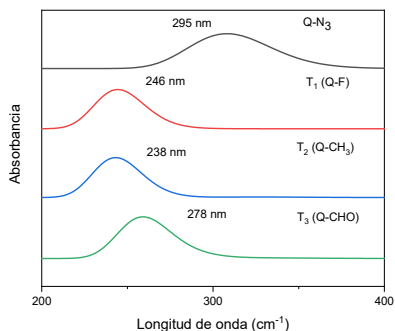


Figura 3. Espectros infrarrojos para derivados 1, 2, 3 triazol-quitosano

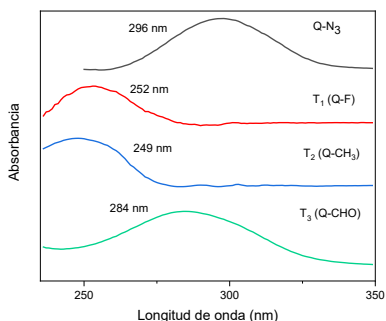
A continuación, al quitosano azidado se le realizó la reacción de química click con diferentes grupos alquinos, utilizando $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y ascorbato de sodio como catalizadores.

Caracterización de derivados de 1, 2, 3 triazol-quitosano

Los derivados 1, 2, 3 triazol-quitosano fueron caracterizados por espectroscopia FTIR, cuyos espectros se muestran en la Figura 3. Además, se realizó un análisis mediante espectroscopia UV-Vis para identificar los grupos cromóforos del compuesto (Figura 4).



(a)



(b)

Figura 4. Espectro ultravioleta visible para derivados 1, 2, 3 triazol-quitosano. Longitudes máximas de onda: cálculos computacionales (a), medición experimental (b)

Para establecer las estructuras optimizadas de los monómeros propuestos para cada derivado, se emplearon cálculos con método teórico DFT para correlacionar los datos experimentales y teóricos.

Actividad antimicrobiana

En la Figura 5 se observan las diferentes zonas de inhibición obtenidas en los ensayos microbiológicos. Tanto el quitosano como sus derivados, presentaron actividad antimicrobiana para los microorganismos evaluados: *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* y *P. aeruginosa*, donde T₁ (Q-F), T₂ (Q-CH₃) y T₃ (Q-CHO) presentaron halos de inhibición similares o mayores a los generados por sí solo por el quitosano extraído.

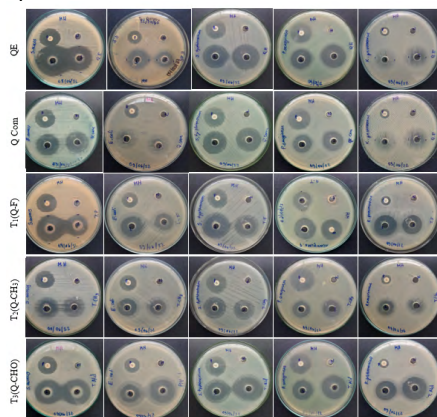
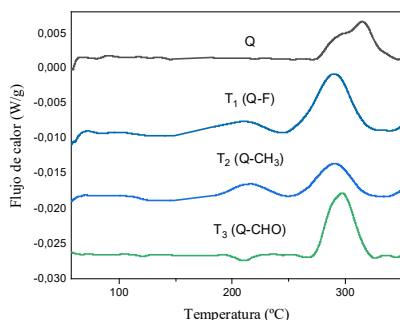


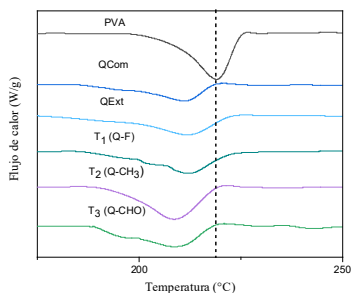
Figura 5. Placas con zonas de inhibición. Zona izquierda de la placa: soluciones de 1 % y zona derecha de la placa: soluciones de 2 %

Calorimetría diferencial de barrido

En la Figura 6 se establecen las temperaturas de degradación térmica de los derivados, las cuales fueron 239, 245 y 239 °C para T_1 (Q-F), T_2 (Q-CH₃) y T_3 (Q-CHO), respectivamente.



(a)



(b)

Figura 6. Termogramas para los derivados de 1, 2, 3 triazol-quitosano (a), y sus películas (b)

Propiedades mecánicas de derivados de 1, 2, 3 triazol-quitosano

En la Figura 7 se observa que dependiendo del tipo de película de derivado 1,2,3 triazol-quitosano, la resistencia a la tracción varía desde 42 MPa hasta 68 MPa.

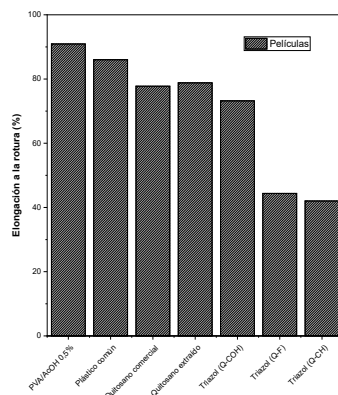
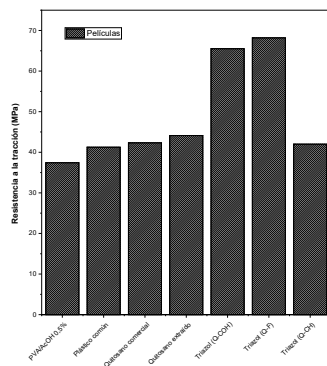


Figura 7. Comparación de propiedades mecánicas entre quitosano y sus derivados 1, 2, 3 triazol-quitosano

Rugosidad en películas en base a derivados de 1, 2, 3 triazol-quitosano

El derivado T_1 (Q-F) al igual que

el quitosano presentan una superficie porosa, mientras que T_2 (Q-CH₃) y T_3 (Q-CHO) poseen estructuras plegadas con colinas y

valles, sus valores de R_q (entre $1,19 \pm 0,46$ y $5,39 \pm 1,88$ nm) y R_a (entre $0,79 \pm 0,25$ y $3,85 \pm 1,03$ nm).

DISCUSIÓN

Obtención de quitosano

El proceso de obtención de quitosano tuvo como paso principal la desacetilación de la quitina, cuya extracción conllevó la molienda, desmineralización y desproteínización de la fuente seleccionada. El porcentaje de rendimiento alcanzado (22,2 %) es concordante con estudios previos que han reportado rendimientos similares (William & Wid, 2019) y menores (Varun et al., 2017; Hossain & Iqbal, 2014). Estas variaciones podrían deberse a la pérdida de partículas de quitosano durante el lavado, la composición química de los desechos de caparzones utilizados, el contenido de humedad, condiciones de desproteínización y desmineralización, entre las principales (Kou et al., 2021).

Caracterización de quitosano

Las bandas que se muestran en el espectro FTIR de la Figura 1, son concordantes con los espectros de muestras de quitosano reportados anteriormente (Varma & Vasudevan, 2020; Queiroz et al., 2015).

El grado de desacetilación (DD) es un parámetro importante que influye en la solubilidad, la reactividad química y biodegradabilidad del producto obtenido. Para determinar el DD por espectroscopía FTIR se seleccionaron dos bandas de absorción: una banda característica o banda sonda que representa el grupo amida de la N-acetil-D-glucosamina y una banda de referencia que representa un grupo que está presente tanto en la N-acetil-D-glucosamina y especies de D-glucosamina. Las bandas

seleccionadas fueron 1323 cm^{-1} y 1423 cm^{-1} , respectivamente, ya que presentan un error experimental bajo comparado con otras técnicas de determinación del DD, además, esta relación es independientemente de la técnica de obtención de quitosano, humedad y del estado del material de partida (Brugnerotto et al., 2001). Para el cálculo del DD se utilizó la ecuación 1 y el valor obtenido fue de 92,96 %.

En la Figura 2 se presentó una curva de titulación potenciométrica con dos puntos de inflexión: el punto V_1 representa la neutralización de HCl por la adición de NaOH mientras que el punto V_2 corresponde a la neutralización de los iones de amonio presentes en la muestra de quitosano (Saba et al., 2018). La determinación de la primera derivada ayudó con la lectura precisa de los puntos de equivalencia, el V_1 y V_2 . La cantidad de grupos amino de quitosano se calculó utilizando la diferencia entre los dos puntos de inflexión aplicando la ecuación 2. Por lo que se confirma el valor de DD del

quitosano de 92,97 %.

Debido a que la despolimerización del quitosano ocurre mediante un ataque nucleofílico de los enlaces glucosídicos por iones de hidróxido durante el proceso de desacetilación y ambos se ven afectados por la concentración de NaOH, temperatura y tiempo de reacción, tanto el peso molecular como el grado de desacetilación están relacionados. Por lo tanto, se determinó que las condiciones de desacetilación establecidas permitieron la obtención de un quitosano de alto grado de desacetilación (92,97 %) y peso molecular medio (453,1 kDa).

Síntesis de derivados de 1, 2, 3 triazol-quitosano

La síntesis de N-(3-azido-2-hidroxipropil) quitosano se llevó a cabo por reacción de quitosano con 1-azido-3-cloropropan-2-ol, que, a su vez, se obtuvo por tratamiento de azida sódica con epíclorhidrina. La introducción de la fracción azida (N_3) en la cadena de quitosano fue confirmada por la presencia de la banda

característica de vibraciones de estiramiento del grupo azida en el espectro FTIR a 2101 cm^{-1} (Figura 3). Finalmente, la reacción de química click se llevó a cabo con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y ascorbato de sodio como catalizadores entre quitosano azidado y los diferentes alquinos como se muestra en la Figura 8.

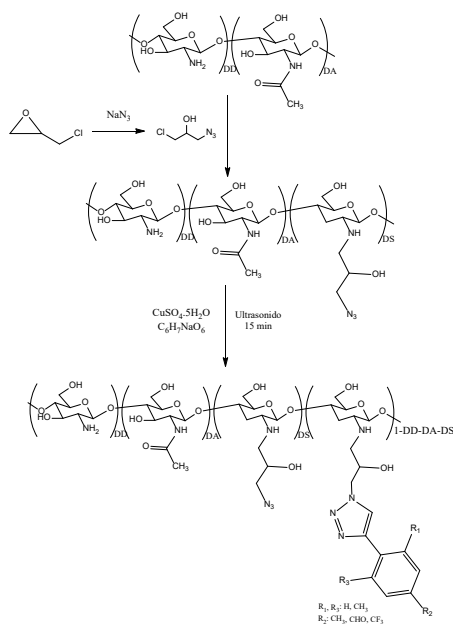


Figura 8. Ruta de síntesis de derivados de 1, 2, 3 triazol-quitosano

Caracterización de derivados de 1, 2, 3 triazol-quitosano

La disminución de la intensidad de la banda correspondiente al grupo

azida a 2101 cm^{-1} en los espectros FTIR (Figura 3) evidencian la conversión del grupo azida (N_3) a un anillo de triazol, sin embargo, se infiere una conversión incompleta, pues el espectro IR muestra bandas de absorción de baja intensidad debidas a porciones de grupo azida que no han reaccionado en la cadena polimérica. Por otra parte, las bandas entre 1585 cm^{-1} y 1595 cm^{-1} se atribuyen a estiramientos del grupo $\text{N}=\text{N}$ del anillo triazol (Tan et al., 2018a; Tan et al., 2018b; Sedghi et al., 2020; Aboelnaga et al., 2017; Zhang et al., 2018; Ryu et al., 2013). Además, se determinó que más de 20 minutos en ultrasonido generan una disminución en el rendimiento de la reacción y un posible grado de degradación lateral de la cadena polimérica del quitosano azidado.

Por otro lado, el análisis de los derivados 1, 2, 3 triazol-quitosano por espectroscopía UV-Vis (Figura 5) permitió evidenciar la presencia de los grupos cromóforos en la cadena polimérica. Estos grupos funcionales, azida y

triazoles, introducidos en la matriz del quitosano absorben luz a longitudes de onda características en la región UV-Vis (Kumirska et al., 2010) y permitieron identificar cualitativamente su presencia en los derivados, apoyando así la información estructural obtenida por espectroscopía IR.

En la Figura 9 se presentan las estructuras optimizadas de los monómeros propuestos para cada derivado. Ya que se definió con los espectros FTIR que la transformación de azida a triazol fue incompleta, se añadió una porción de grupo azida en la cadena polimérica con el propósito de obtener bandas aproximadas a las experimentales. Se emplearon cálculos con método teórico DFT para correlacionar los datos experimentales y teóricos. La precisión de los resultados aumentó notablemente cuando se tuvo en cuenta los efectos del disolvente simulados con el nivel de teoría B3LYP/6-31G (Abdelghany et al., 2021). De esta forma, se pudo contrastar y confirmar los modos vibraciones del anillo del triazol en

los espectros FTIR y las longitudes de onda máxima de cada derivado en los espectros UV-Vis.

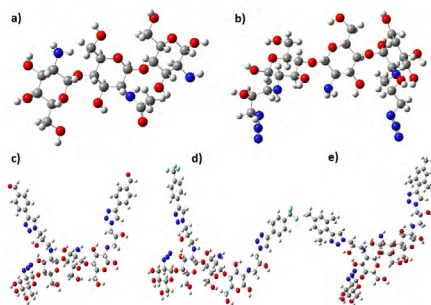


Figura 9. Estructuras teóricas de los monómeros para cada derivado. Quitosano (a), quitosano azidado (b), $T_3(Q-CHO)$ (c), $T_1(Q-F)$ (d), $T_2(Q-CH_3)$ (e)

Actividad antimicrobiana

Un factor relevante en la actividad antimicrobiana del quitosano y sus derivados fue la concentración de quitosano, donde la mayoría de los ensayos presentaron actividad antimicrobiana mayor en concentraciones de 1 % como se observa en la Figura 10, esto se puede analizar en términos de la disposición espacial de las cadenas poliméricas (Goy et al., 2016). Pues concentraciones bajas del polímero podrían tener una mejor distribución molecular

en el solvente con un número relativamente pequeño de interacciones entre las cadenas vecinas, maximizándose los sitios cargados disponibles para el acoplamiento externo. Por otro lado, a medida que aumenta la concentración, se facilita la formación de enlaces de hidrógeno y covalentes entre los grupos funcionales de las cadenas del biopolímero reduciendo la dispersión y lleva a la estructura a asumir una conformación enrollada densamente superpuesta (Ardean et al., 2021).

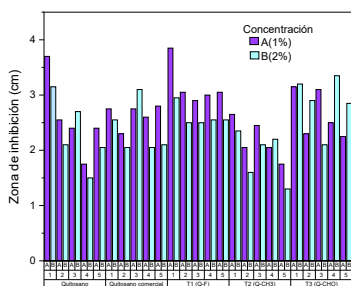


Figura 10. Zonas de inhibición. *S. aureus* (1), *E. coli* (2), *S. typhimurium* (3), *P. aeruginosa* (4), *K. pneumoniae* (5)

Las zonas de inhibición muestran la acción sinérgica de todos los grupos funcionales existentes en la cadena polimérica del quitosano,

la actividad antimicrobiana depende principalmente del grado de sustitución de los grupos de injerto y el efecto en la densidad de la carga positiva del quitosano que tengan estos en la estructura (Li & Zhuang, 2020). Existe una gran diferencia entre los diferentes derivados obtenidos lo cual indica la influencia de los grupos sustituyentes en el anillo aromático. Por lo tanto, la optimización de la cadena lateral del triazol podría llevar al desarrollo de nuevos compuestos con mejores características antimicrobianas.

Calorimetría diferencial de barrido derivados de 1, 2, 3 triazol-quitosano

Las muestras sólidas presentan picos endotérmicos conocidos como temperaturas de deshidratación entre 130 y 150 °C lo cual se debe a la evaporación del agua y moléculas de ácido acético unidas a la estructura del quitosano y sus derivados (Hafizi et al., 2023).

Además, existe un pico

exotérmico en el quitosano que se asigna a su degradación térmica (escisión del enlace glucósido y, descomposición de las unidades acetiladas y desacetiladas). Los picos exotérmicos alrededor de 290 y 315 °C en los derivados corresponden a la descomposición térmica de las respectivas estructuras (Chandra et al., 2016). Las temperaturas de descomposición de los derivados son relativamente menores, lo cual indica una disminución en la estabilidad debido al cambio de la estructura cristalina como consecuencia de las modificaciones estructurales. El quitosano no presenta un pico específico para el fenómeno de la transición vítrea ya que éste absorbe humedad y posee una cadena polimérica muy rígida por lo que el cambio en la capacidad calorífica correspondiente a la variación de volumen específico en la Tg es muy pequeño y difícil de observar, aunque se han reportado valores menores a 200 °C (Dong et al., 2004). Contrario a los derivados, las ramificaciones de los nuevos biopolímeros disminuyen su

carácter cristalino y es posible observar estas temperaturas. Las cuales fueron 239, 245 y 239 °C para T_1 (Q-F), T_2 (Q-CH₃) y T_3 (Q-CHO), respectivamente, pues la Tg suele aumentar a medida que el carácter amorfo es mayor (Rahman et al., 2019).

Los termogramas para las películas de los derivados no presentan temperaturas de deshidratación (Figura 6), lo que indica que existió una evaporación total del agua asociada a los grupos hidrofílicos del polímero durante el proceso de secado. Las películas exhibieron; a parte de los picos antes mencionados, una fuerte transición de fusión endotérmica aproximadamente en 222 °C correspondiente al PVA asociado en las películas (Rafique et al., 2016).

Propiedades mecánicas de los derivados de 1, 2, 3 triazol-quitosano

Las propiedades mecánicas reflejan la capacidad de la película para proteger la integridad de los alimentos. Los valores de

resistencia mecánica de los derivados 1, 2, 3 triazol-quitosano, fueron mayores a los obtenidos para el quitosano extraído (Figura 7), un quitosano comercial y un plástico de empaque común. En el caso de % de elongación a la rotura, el quitosano extraído presenta valores similares al plástico de empaque y mayores a sus derivados. Esto se debe a que las fuerzas intermoleculares entre el alcohol polivinílico y el quitosano son mayores debido a la cantidad de secciones con carga positiva debido a los grupos amino, las cuales interaccionan con la carga negativa del grupo hidroxilo a lo largo de las cadenas del alcohol polivinílico desarrollando enlaces de hidrógeno polímero-plastificante, reemplazando las interacciones polímero-polímero en las películas del biopolímero, haciéndolo más flexible, es decir, con menor resistencia a la tracción y una mejor elongación (Thakhiew et al., 2015).

En el caso del derivado T_3 (Q-CHO), su grupo carbonilo aporta mayores interacciones de tipo puente

de hidrógeno con el alcohol polivinílico que los otros derivados, por lo tanto, su resistencia a la tracción como el porcentaje de elongación son más altos. Los bajos porcentajes obtenidos para los derivados T_1 (Q-F) y T_2 (Q-CH₃) son comparables con valores reportados de polímeros de empaque alimenticio como el polipropileno (Aljilji et al., 2020).

Rugosidad de los derivados de 1, 2, 3 triazol-quitosano

Se analizó la morfología de la superficie de las películas de los derivados de 1, 2, 3 triazol-quitosano, de quitosano y de una referencia, para el que se utilizó una película de empaque común. El cambio químico condujo a cambios en la matriz estructural de las películas de quitosano evidenciados en la topografía superficial. Aunque claramente se ven diferencias en las superficies de las películas; el derivado T_1 (Q-F) al igual que el quitosano presentan una superficie porosa, mientras que T_2 (Q-CH₃) y T_3 (Q-CHO) poseen estructuras plegadas con colinas y valles, sus

valores de R_q (entre $1,19 \pm 0,46$ y $5,39 \pm 1,88$ nm) y R_a (entre $0,79 \pm 0,25$ y $3,85 \pm 1,03$ nm) definen a estas películas como superficies planas y homogéneas (Min et al., 2020). Además, comparados con una película de empaque común presentan valores menores ($r_a=5.50\pm0.90$ nm y $r_q=6,84\pm1,13$ nm).

Se observa un cambio en la rugosidad entre PVA puro y las películas derivadas del uso de este plastificante, tal aumento indica la presencia de interacciones entre los componentes de la mezcla, como enlaces de hidrógeno que hace que estas superficies sean relativamente planas (Stachowiak et al., 2020).

CONCLUSIÓN

Se obtuvo quitosano a partir de exoesqueletos de camarón, su caracterización por viscosimetría capilar, espectroscopia infrarroja y titulación potenciométrica determinaron que el quitosano extraído es un producto de peso molecular medio y alto grado de desacetilación.

La funcionalización de la matriz de quitosano se realizó a través de reacciones de química click de tipo cicloadición azida-alquino para la obtención de los derivados de 1, 2, 3 triazol quitosano a partir de quitosano azidado y diferentes alquinos aromáticos. Su caracterización se consolidó mediante la comparación de los

modos vibracionales del anillo del triazol y las longitudes de onda máxima en los resultados de cálculos teóricos de monómeros diseñados de cada derivado. Los ensayos microbiológicos contra *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. typhimurium* de soluciones al 1% demostraron una mejor actividad antimicrobiana para los derivados T_1 (Q-F) y T_2 (Q-CH₃). Las películas formuladas exhibieron mayor resistencia a la tracción y mayores porcentajes de elongación antes de la rotura, cercanos a una película de empaque alimenticio comercial. Además, se determinó que todas las películas de los

diferentes derivados de 1, 2, 3 triazol-QUITOSANO/PVA mantienen un comportamiento térmico similar. La rugosidad de las películas mostró valores de R_q (entre $1,19 \pm 0,46$ y $5,39 \pm 1,88$ nm) y R_a (entre $0,79 \pm 0,25$ y $3,85 \pm 1,03$ nm) menores a las de un plástico comercial. Las superficies se definen como homogéneas. Las películas obtenidas a partir

de los derivados de 1, 2, 3 triazol-QUITOSANO sintetizados a partir de reacciones de cicloadición azida-alquilbenceno se presentan como superficies térmicamente estables, formuladas con compuestos con actividad antimicrobiana, planas y homogéneas, por lo tanto, aplicables como empaques alimenticios.

AGRADECIMIENTO

Este estudio se llevó a cabo en el marco del proyecto “Desarrollo y caracterización de fibras y películas multifuncionales biopoliméricas nanoestructuradas dopadas con heterociclos halogenados”, y fue financiado por Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador.

El autor principal agradece al Laboratorio de Mecánica de Materiales de la Universidad de las Fuerzas Armadas y al Centro de Investigaciones Aplicadas a Polímeros de la Escuela Politécnica Nacional por la colaboración prestada.

LISTA DE REFERENCIAS

- Abdelghany, A. M., Aboelwafa, M. A. & Meikhail, M. S. (2021) ‘Experimental and DFT studies on the structural and optical properties of chitosan/polyvinyle pyrrolidone/ZnS nano composites’, Research Square, 1–23. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-331123/v1>.
- Aboelnaga, A., Shaarawy, S. & Hagar, M. (2017). A novel chitosan 3-amino-1,2,4-triazole hybrid: Preparation and its effects on cotton fabric properties, Journal of Taibah University for Science, 11(5), 768–774.

- Aljilji, A. et al. (2020). Mechanical properties of dried fruit packaging materials, *Periodicals of Engineering and Natural Sciences*, 8(4), 2547–2552.
- Ardean, C. et al. (2021). Factors influencing the antibacterial activity of chitosan and chitosan modified by functionalization, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7749.
- Arshad, M., Zubair, M. & Ullah, A. (2020) Miscibility, properties, and biodegradability of chitin and chitosan, *Handbook of Chitin and Chitosan*. INC. doi: 10.1016/b978-0-12-817970-3.00012-2.
- Bhargava, N. et al. (2020). Active and intelligent biodegradable packaging films using food and food waste-derived bioactive compounds: A review, *Trends in Food Science and Technology*, 105, 385–401.
- Brugnerotto, J. et al. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, *Polymer*, 42(8), 3569–3580.
- Chandrasekharan, A. et al. (2019). Acid-treated water-soluble chitosan suitable for microneedle-assisted intracutaneous drug delivery, *Pharmaceutics*, 11(5), 1–14.
- Chauhan, N. P. S. et al. (2019) Heterotelechelic multiblock polymers using click chemistry, In: *Advanced Functional Polymers for Biomedical Applications*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/b978-0-12-816349-8.00007-2.
- de Queiroz Antonino, R. S. C. M., Lia Fook, B. R. P., de Oliveira Lima, V. A., de Farias Rached, R. Í., Lima, E. P. N., da Silva Lima, R. J., ... & Lia Fook, M. V. (2017). Preparation and characterization of chitosan obtained from shells of shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Marine drugs*, 15(5), 141.
- Dey, S. C., Al-Amin, M., Rashid, T. U., Sultan, M. Z., Ashaduzzaman, M., Sarker, M., & Shamsuddin, S. M. (2016). Preparation, characterization

and performance evaluation of chitosan as an adsorbent for remazol red. *Int. J. Latest Res. Eng. Technol*, 2(2), 52-62.

Dong, Y. et al. (2004). Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques, *Journal of Applied Polymer Science*, 93(4), 1553–1558.

Gonçalves, C., Ferreira, N. & Lourenço, L. (2021). Production of low molecular weight chitosan and chitooligosaccharides (COS): A review, *Polymers*, 13(15), 1–23.

Goy, R. C., Morais, S. T. B. & Assis, O. B. G. (2016). Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. Coli* and *S. aureus* growth, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(1), 122–127.

Hafizi, T., Shahriari, M. H., Abdouss, M., & Kahdestani, S. A. (2023). Synthesis and characterization of vancomycin-loaded chitosan nanoparticles for drug delivery. *Polymer Bulletin*, 80(5), 5607-5621.

Hein, C. D., Liu, X. M. & Wang, D. (2008). Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences, *Pharmaceutical Research*, 25(10), 2216–2230.

Kou, S. G., Peters, L. M. & Mucalo, M. R. (2021) Chitosan: A review of sources and preparation methods, *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005.

Kritchenkov, A. S., Egorov, A. R., Kurasova, M. N., et al. (2019). Novel non-toxic high efficient antibacterial azido chitosan derivatives with potential application in food coatings, *Food Chemistry*, 301, 125247.

Kritchenkov, A. S., Egorov, A. R., Dysin, A. P., et al. (2019). Ultrasound-assisted Cu(I)-catalyzed azide-alkyne click cycloaddition as polymer-analogous transformation in chitosan chemistry. High antibacterial and transfection activity of novel triazol betaine

chitosan derivatives and their nanoparticles, *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, 592–603.

Kritchenkov, A. S. et al. (2020). Active antibacterial food coatings based on blends of succinyl chitosan and triazole betaine chitosan derivatives, *Food Packaging and Shelf Life*, 25, 100534.

Kumirska, J. et al. (2010). Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan, *Mar Drugs*, 8(5), 1567–1636.

Li, J. & Zhuang, S. (2020). Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives, *European Polymer Journal*, 138, 109984.

Malar, C. G., Seenuvasan, M., Kumar, K. S., & Kumar, M. A. (2021). Synthesis and applications of Chitosan: A contemporary macromolecule. In *Microbial and Natural Macromolecules* (pp. 73-86). Academic Press.

Min, T. et al. (2020). Highly efficient antifogging and antibacterial food packaging film fabricated by novel quaternary ammonium chitosan composite, *Food Chemistry*, 308, 125682.

Negrea, P. et al. (2015). The study of infrared spectrum of chitin and chitosan extract as potential sources of biomass, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 10(4), 1129–1138.

Queiroz, M. F. et al. (2015). Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation?, *Mar Drugs*, 13(1), 141–158.

Rafique, A. et al. (2016). Chitosan functionalized poly(vinyl alcohol) for prospects biomedical and industrial applications: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 141–154.

Rahman, N. A. et al. (2019). Synthesis and characterizations of

o-nitrochitosan based biopolymer electrolyte for electrochemical devices, PLOS ONE, 14(2), 1–17.

Ryu, H. J. et al. (2013). Synthesis of click-coupled graphene sheet with chitosan: Effective exfoliation and enhanced properties of their nanocomposites, European Polymer Journal, 49(9), 2627–2634.

Saba, T. et al. (2018). Efficient Removal of Reactive Orange 107 Dye from Aqueous Media by Shrimp Shell Derived Chitosan Functionalized Magnetic Nanoparticles, American Journal of Analytical Chemistry, 09(12), 633–653.

Sedghi, R., Shaabani, A. & Sayyari, N. (2020). Electrospun triazole-based chitosan nanofibers as a novel scaffolds for bone tissue repair and regeneration, Carbohydrate Polymers, 230, 115707.

Shah, A., Hussain, I. & Murtaza, G. (2018). Chemical synthesis and characterization of chitosan/silver nanocomposites films and their potential antibacterial activity, International Journal of Biological Macromolecules, 116, 520–529.

Singh, R. Mehrotra, T., Bisaria, K., & Sinha, S. (2021) Environmental hazards and biodegradation of plastic waste: challenges and future prospects, Bioremediation for Environmental Sustainability. 193–214. INC. doi: 10.1016/b978-0-12-820524-2.00009-2.

Sivashankari, P. R., & Prabakaran, M. (2017). Deacetylation modification techniques of chitin and chitosan. In Chitosan Based Biomaterials Volume 1 (pp. 117-133). Woodhead Publishing.

Sunitha, T. G. et al. (2021). Micro-plastic pollution along the Bay of Bengal coastal stretch of Tamil Nadu, South India, Science of the Total Environment, 756, 144073.

Tan, W. et al. (2016). Synthesis and antioxidant property of novel 1,2,3-triazole-linked starch derivatives via “click chemistry”,

International Journal of Biological Macromolecules, 82, 404–410.

Tan, W., Li, Q., Dong, F., Zhang, J., Luan, F., Wei, L., ... & Guo, Z. (2018a). Novel cationic chitosan derivative bearing 1,2,3-triazolium and pyridinium: Synthesis, characterization, and antifungal property, *Carbohydrate Polymers*, 182, 180–187.

Tan, W., Zhang, J., Zhao, X., Dong, F., Li, Q., & Guo, Z (2018b). Synthesis and antioxidant action of chitosan derivatives with amino-containing groups via azide-alkyne click reaction and N-methylation, *Carbohydrate Polymers*, 199, 583–592.

Tan, W. et al. (2020). Enhanced antifungal activity of novel cationic chitosan derivative bearing triphenylphosphonium salt via azide-alkyne click reaction, *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 1765–1772.

Thakhiew, W. et al. (2015). Improvement of mechanical properties of chitosan-based films via physical treatment of film-forming solution, *Journal of Food Engineering*, 158, 66–72.

Varma, R. & Vasudevan, S. (2020) Extraction, characterization, and antimicrobial activity of chitosan from horse mussel modiolus modiolus, *ACS Omega*, 5(32), 20224–20230.

Weißpflog, J. et al. (2021) Characterization of chitosan with different degree of deacetylation and equal viscosity in dissolved and solid state – Insights by various complimentary methods', *International Journal of Biological Macromolecules*, 171, 242–261.

Welden, N. A. (2020) The environmental impacts of plastic pollution, In *Plastic Waste and Recycling*. (pp.195-222). Academic Press Elsevier Inc. doi: 10.1016/b978-0-12-817880-5.00008-6.

William, W. and Wid, N. (2019) Comparison of extraction sequence on yield and physico-chemical characteristic of chitosan from shrimp

shell waste, Journal of Physics: Conference Series, 1358(1).

Xi, W. et al. (2014). Click chemistry in materials science, Advanced Functional Materials, 24(18), 2572–2590.

Zhang, Z. et al. (2018). A novel approach to 1,2,3-triazole grafted chitosans via modified Wolff's cyclocondensation, European Polymer Journal, 98, 492–498.