



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**OBTENCIÓN DE FIBRAS DE QUITOSANO POR LA TÉCNICA DE
ELECTROHILADO Y SU CARACTERIZACIÓN**

TESIS DE MAESTRÍA

**QUE PARA OBTENER GRADO DE
MAESTRA EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

GUADALUPE CUAHUIZO HUITZIL

ASESORA:

DRA. VERÓNICA SANTACRUZ VÁZQUEZ

COASESORA:

M.I. MARÍA JUANA PAREDES BAUTISTA

BUAP

H. Puebla Z., NOVIEMBRE 2018



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN INGENIERÍA QUÍMICA



ACTA DE REVISIÓN, LIBERACIÓN E IMPRESIÓN DE TESIS

Nombre de la estudiante: Guadalupe Cuahuizo Huitzil

Matrícula: 216470470

Nombre del director: DRA. VERONICA SANTACRUZ VAZQUEZ

Nombre del codirector: M.I. MA. JUANA PAREDES BAUTISTA

Título de la Tesis:

**“OBTENCIÓN DE FIBRAS DE QUITOSANO POR LA TÉCNICA DE ELECTROHILADO Y SU
CARACTERIZACIÓN”**

Comisión Revisora:


Presidente: Dra. Claudia Santacruz Vázquez

Firma: 

Secretario: Dr. Jesús Hinojosa Moya

Firma: 

Vocal (1): M.I. María Juana Paredes Bautista

Firma: 

Vocal (2): Dra. Verónica Santacruz Vázquez

Firma: 

Los integrantes de la Comisión Revisora expresamos que hemos leído y revisado el manuscrito de la tesis de maestría que presenta el (la) estudiante arriba indicado, por lo que **estamos de acuerdo en que se proceda con la impresión definitiva de la tesis y que el (la) estudiante presente su defensa y examen de grado en la fecha, horario y lugar que se indican a continuación.**

Fecha de examen: 10 de Diciembre de 2018

Hora: 13:00 pm

Día de la semana: Lunes

Lugar: FIQ7 (302)



Revisa y Autoriza: Sello de la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado, FIQ.- BUAP

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su comprensión y apoyo a largo de todos estos años.

A mí hermano Rene por darme su apoyo constante.

Agradezco a dios por darme la vida.

*A la M.I María Juana Paredes Bautista por haberme brindado la oportunidad de trabajar
en su proyecto de investigación.*

*Dra. Verónica Santacruz Vázquez, Dra. Claudia Santacruz Vázquez y Dr. J. Jesús
Hinojosa por haber contribuido en el desarrollo de este trabajo.*

AGRADECIMIENTOS

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por darme una formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para obtener el grado de Maestría, y por brindarme esta oportunidad para desarrollarme profesionalmente.

.....Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudio de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del programa II. Investigación y Posgrado. Aseguramiento de la Calidad en el Posgrado. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2013-2017.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Unidad estructural de la QN y QS.....	1
Figura 1.2. Densidad de carga QS.....	2
Figura 1.3. Solubilización QS.....	3
Figura 1.4. Estructura de la pared celular de los hongos.....	5
Figura 1.5. Composición de la pared celular.....	6
Figura 1.6. Curva de titulación QS extraído de <i>Ganoderma lucidum</i>	8
Figura 1.7. Encapsulación de QS y PVA.....	13
Figura 1.8. Representación esquemática de electrohilado a) vertical b) horizontal.....	14
Figura 1.9. Diagrama esquemático del proceso de electrohilado.	15
Figura 1.10. Estructura del PVA.....	21
Figura 2.1. Diagrama de bloques para la obtención de QS de <i>Pleurotus ostreatus</i>	25
Figura 3.1. Hongo seta con sus partes principales.....	29
Figura 3.2 Velocidad de secado.....	31
Figura 3.3 Diagrama esquemático del proceso de extracción de QS.....	31
Figura 3.4. Desacetilación de la quitina.....	34
Figura 3.5. Adición nucleofílica del grupo hidroxilo.....	34
Figura 3.6. Eliminación del grupo amino.....	34
Figura 3.7. Equilibrio ácido – base entre el ácido carboxílico y la amina.....	35
Figura 3.8. Espectro de IR de QS Comercial 3M y 11 M.....	37
Figura 3.9. Curva de titulación quitosano a) 3 M b) 11M.....	38
Figura 3.10. Termograma de QS comercial, 3 M y 11M.....	41
Figura 3.11. TGA quitosano 3M y comercial.....	42
Figura 3.12. Análisis Reológico de a) QS extraído y b) PVA 10%.....	44
Figura 3.13. Análisis Relógico de soluciones líquidas de QS/PVA a) 25/75 y b) 35/65....	44
Figura 3.14. Análisis Reológico de soluciones sólidas QS/PVA a) S 10% y b) S 8%.....	45
Figura 3.15. Micrografías de QS/PVA sólidas a) 10% y b) 8%.....	46
Figura 3.16. Micrografías QS/PVA líquidas a) 25/75 y b) 35/65.....	47
Figura 3.17. Esquema del balance de materia del sistema de estudio.....	48

Figura 3.18. Determinación del peso de la microfibras experimental.....	49
Figura 3.19. Mecanismo de reacción de la ninhidrina y un aminoácido.....	51
Figura 3.20. Blancos de QS y PVA.....	51
Figura 3.21. Resultados de las soluciones sólidas y líquidas con ninhidrina.....	51
Figura 3.22. Espectros FT-IR microfibras sólidas QS / PVA.....	53
Figura 3.23. Espectroscopia Raman de las microfibras.....	54
Figura 3.24. Termogramas DSC de microfibras sólidas QS/PVA.....	55
Figura 3.25. TGA microfibras sólidas QS / PVA.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Extracción de QS de micelios por diferentes métodos.....	7
Tabla 1.2. Coeficientes correlación de la relación A_M/A_R vs DD.....	11
Tabla 1.3 Parámetros que influyen en el proceso de electrohilado.....	16
Tabla 1.4. Propiedades de las nanofibras a base de QS.....	17
Tabla 1.5. Metodologías de electrohilado QS/PVA.....	18-19
Tabla 1.6 Clasificación de micro y nanofibras obtenidas por electrohilado.....	20
Tabla 1.7. Propiedades del ácido acético.....	22
Tabla 3.1. Rendimientos de QS.....	35
Tabla 3.2. Valoración Potenciométrica de QS 3M y 11M.....	38
Tabla 3.3. DD de QS por IR 3M y 11M.....	39
Tabla 3.4. Recomendaciones generales para la aplicación del QS.....	40
Tabla 3.5. Parámetros de las soluciones electrohiladas.....	43
Tabla 3.6. Diámetros promedios a partir de las micrografías SEM.....	48
Tabla 3.7 Balances de materia experimental y teórico.....	50

INDICE

Resumen	IX
Introducción	X
Justificación	XI
Objetivo general	XIII
Objetivos específicos	XIII
Capítulo 1	
Antecedentes	1
Quitosano.....	1
Obtención de quitosano	3
Método Químico	4
Método Enzimático.....	4
Obtención de quitosano en hongos método químico.....	5
Grado de desacetilación quitosano	7
Valoración potenciométrica quitosano	7
Espectroscopia infrarroja (IR)	8
Nanotecnología.....	11
Técnica de Electrohilado	13
Nanofibras	20
Material encapsulante PVA.....	21
Solvente Ácido Acético	22
Capítulo 2	
Metodología	23
Obtención de quitosano	23
Identificación del polímero.....	24
Grado de desacetilación (DD) por valoración potenciométrica.	24
Espectroscopia Infrarroja (IR).....	26
Calorimetría Diferencial de Barrido y Análisis termogravimétrico (DSC/TGA).	26
Soluciones quitosano y alcohol polivinílico.....	26
Análisis reológico de las soluciones.....	27
Proceso de electrohilado.....	27
	VI

Evaluación de las características morfológicas de las microfibras.....	27
Espectroscopia Infrarroja de las microfibras.	27
Espectroscopia Raman de las micro y nanofibras.	28
Calorimetría Diferencial de Barrido y Análisis termogravimétrico de las micro y nanofibras (DSC/TGA).	28
Determinación cualitativa de grupos aminos con ninhidrina.	28
Balance de Materia a partir de los datos experimentales.....	28
Capítulo 3	
Resultados y discusión	29
Etapas del proceso de obtención de quitosano.	29
Proceso de desacetilación.	32
Desacetilación de la Quitina.	35
Solubilización y precipitación de Quitosano.	35
Identificación del polímero mediante Espectroscopia Infrarroja.	36
Caracterización del QS.	37
Grado de desacetilación por valoración potenciométrica.	37
Grado de desacetilación por Espectroscopia Infrarroja.	38
Calorimetría Diferencial de Barrido QS.	40
Análisis Temogravimétrico QS.	42
Caracterización de las soluciones de PVA y QS.	43
Morfología de las microfibras.	45
Balance de materia para contenido de Quitosano final.	48
Identificación de Aminoácidos cualitativamente con ninhidrina.	50
Espectroscopia FTIR microfibras.....	52
Espectroscopia Raman de las microfibras.....	53
Calorimetría Diferencial de barrido de las microfibras (DSC).....	54
Análisis Termogravimétrico de las microfibras.	56
Conclusiones	58
Bibliografía	60

Producción académica asociada a este trabajo

6° Simposio Nacional de Ingeniería Química y Bioquímica Aplicada-Foro Regional
IMIQ 2017.

XXXIX Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y
Docencia en Ingeniería Química A.C. (AMIDIQ).

V Encuentro Internacional sobre Biotecnología en la UATx.

Resumen

Las setas fueron obtenidas en su etapa de fructificación en la empresa Setas del bosque, S del R.L. de la ciudad de Puebla, para la obtención de QS se retoma el método de Nwe (2010). Para la etapa de desacetilación de QN se usa NaOH 1, 3 y 11 M, con el objetivo de comparar los rendimientos; en la solubilización se utiliza CH_3COOH 0.35 M, $T=95\text{ }^\circ\text{C}$ y 3h. Los rendimientos obtenidos son de 0.3466, 0.4160 y 0.8627% respectivamente. Una solución 11 M, es altamente corrosiva, difícil de manejar y ocasiona daños ambientales en cuanto a residuos. Al utilizar una concentración de 1 M de NaOH su rendimiento es bajo, motivo por el que se decide trabajar con una concentración de 3 M para la obtención de las microfibras. El grado de desacetilación (DD) es una de las características químicas más importantes que influyen en muchas de sus aplicaciones, por consiguiente es esencial determinar el DD para saber cuál será su utilización. El DD se determina por Valoración Potenciométrica (VP) y Espectroscopia Infrarroja (IR), obteniéndose los valores de 61.36 y 81.73. Para reducir la pérdida de la solución de QS al momento de electrohilar, se determina eliminar la etapa de precipitación de dicho biopolímero, permitiendo de esta manera la incorporación de PVA sólido en la etapa de Solubilización de QS. Se obtuvieron películas formadas por microfibras con morfología uniforme, lisa, y diámetro promedio de 249 nm con el QS extraído de hongo seta. Observándose que al aumentar la proporción de la solución de QS, el diámetro de las microfibras se redujo, generando una membrana tridimensional altamente porosa que puede ser utilizada como matriz para el crecimiento de tejidos dado el DD obtenido. Los resultados de FTIR, DSC y TGA confirman que las microfibras se componen de QS y PVA.

Introducción

En la actualidad la industria de alimentos, farmacéutica y biomédica se encuentran en constante búsqueda de nuevos materiales y técnicas que permitan mejorar las características de sus productos actuales o el desarrollo de nuevos productos, con la finalidad de satisfacer las necesidades cambiantes de los consumidores.

En base a lo publicado por la Encuesta I+D en la industria farmacéutica 2013, los proyectos de investigación se han enfocado principalmente en el desarrollo de herramientas y materiales biotecnológicos para las áreas de oncología, dermatología entre otras (FarmaIndustria, 2014).

En cuanto a la industria Biomédica, el desarrollo de nuevos materiales es considerado un sector intensivo en inversión para la investigación e innovación de sus productos, ya que basan su estrategia de competencia del mercado en el lanzamiento de nuevas soluciones farmacológicas o biomédicas para el cuidado de la salud, la belleza y mejoramiento de la calidad de vida de sus consumidores.

Actualmente existen diversas innovaciones en las técnicas para el desarrollo de nanomateriales, que permiten la protección de micro y macronutrientes con la técnica de encapsulación por membranas permeables de origen orgánico o polimérico (Loera *et al.*, 2012). Entre las técnicas innovadoras se encuentra la denominada electrospinning o electrohilado; técnica que ha permitido el desarrollo de fibrillas a escala micro o nanométrica y con nuevas estructuras a partir de polímeros sintéticos o de origen natural (Nandana & Subhas, 2010). En la búsqueda de dar respuesta a las necesidades de innovación en materiales, se pretende mediante la técnica de electrohilado elaborar micro y nanofibras con propiedades y características únicas de Quitosano (QS), que puedan ser aplicadas en las áreas biomédicas y farmacológicas. El QS es un biopolímero de fácil obtención y se ha utilizado ampliamente en diversas aplicaciones de industria farmacéutica debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, y bioactividad (Wu *et al.*, 2005).

Justificación

Es necesaria la búsqueda de nuevos biomateriales, formas de extracción y aplicación que representen una opción para la cura y tratamiento de enfermedades cutáneas con una rápida regeneración tisular, actividad antimicrobiana, degradable entre otras propiedades (Flores-reyes *et al.*, 2015).

El quitosano (QS) es un biomaterial que ha sido evaluado y utilizado para la reconstrucción de tejido, específicamente en la fabricación de matrices que soportan el crecimiento celular. Este tipo de matrices exigen una estructura tridimensional porosa, con diámetros de poro definidos y propiedades mecánicas apropiadas para esta aplicación (Rafique *et al.*, 2016), no obstante su precio es relativamente alto, lo que representa una desventaja para su uso.

De acuerdo a la literatura son varias las fuentes para extracción del QS entre ellas, residuos animales como crustáceos e insectos; esta fuente permite la obtención de QS de alto peso molecular (9.4×10^6 KDa). Otra de las fuentes de obtención de QS reportada en la literatura es el QS de bajo peso molecular y su grado de desacetilación bajo-medio (DD) extraído de hongos que le permite ser considerado como una opción para las aplicaciones terapéuticas y enfermedades cutáneas (Wang *et al.*, 2009).

Pochanavanich, (2002) caracterizó el peso molecular (PM) y su (DD) de diferentes especies de hongos como: *Aspergillus niger* PM 1.4×10^5 g/mol y 90 DD, *Lentinus edodes* PM 1.9×10^5 g/mol y 78.5 DD, *Pleurotus sajo-caju* PM 1.1×10^5 g/mol y 83.8 DD, *Rhizopus oryzae* PM 6.8×10^5 g/mol y 87.9 DD.

Dado que nuestro país es el mayor productor de Latinoamérica de hongos comestibles, cuyos volúmenes de producción en México ascienden a más o menos 62,374 toneladas anuales se cree que esta fuente podría ser explorada con mayor profundidad para la obtención del QS (Martínez-Carrera *et al.*, 2010).

Por otro lado, el electrohilado es una técnica de fabricación versátil que se utiliza para producir fibras con diámetros del orden de decenas de nanómetros a micras, y permite un control sobre el diámetro, longitud, alineación y morfología de las fibras obtenidas y por lo tanto se hace un excelente candidato para su uso en enfermedades cutáneas y la reconstrucción de tejido (Erickson *et al.*, 2015).

Por lo tanto este trabajo busca el desarrollo de micro y nanofibras de alcohol polivinílico (PVA) que permitan encapsular QS obtenido del hongo seta (*Pleurotus ostreatus*) con posibles aplicaciones farmacéuticas y biomédicas.

Objetivo general

Desarrollar el proceso para la obtención de micro y nanofibras de Quitosano (QS) obtenido del hongo *Pleurotus ostreatus* empleando el método de electrohilado y Alcohol Polivinílico (PVA) como material de recubrimiento.

Objetivos específicos

- Definir las condiciones para la obtención de QS a partir del hongo *Pleurotus ostreatus*, empleando el método químico.
- Caracterización del QS obtenido.
- Establecer las condiciones de operación para la obtención de micro y nanofibras de PVA y QS obtenido experimentalmente mediante el método químico.
- Determinar las características físicas y químicas de micro y nanofibras de QS y PVA obtenidas.

Capítulo 1

Antecedentes

Quitosano

El quitosano (QS) es un polímero lineal formado por monómeros de glucosamina y en menor medida de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces β 1-4, su denominación química, según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), es 2-amino-2-Desoxi-D-glucopiranososa (D-glucosamina GlcN) y 2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranososa (N-acetil glucosamina) (Rodríguez *et al.*, 2009). El QS es un producto natural derivado de la quitina (QN), polisacárido presente en el exoesqueleto de artrópodos y zooplancton marinos, que forma parte de la pared celular de algunas familias de hongos, y también está presente en las alas y cutícula de algunas especies de insectos, siendo importante señalar que la QN es el segundo polisacárido natural más abundante después de la celulosa (Balanta *et al.*, 2010; Hernández 2004).

Cuando se modifica la estructura de la QN (Figura 1.1) se remueven los grupos acetilo unidos al grupo amino del Carbono C2 en el anillo del glucano por medio de una hidrólisis alcalina a elevadas temperaturas y se produce el (1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxi- β -D-glucano (Glucosamina) y (1 \rightarrow 4)-2-acetamida-2-deoxi- β -D-glucano (N-Acetil-glucosamina), conocido como QS (Figura 1.1) con predominio de la glucosamina (Rico, 2013).

El QS es obtenido a través de la desacetilación parcial en estado sólido bajo condiciones alcalinas con hidróxido de sodio concentrado. El objetivo de realizar la desacetilación es obtener un compuesto de características fisicoquímicas con elevada proporción de grupos amino libres, mayor solubilidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad comparada con la QN (Balanta *et al.*, 2010; Rico, 2013).

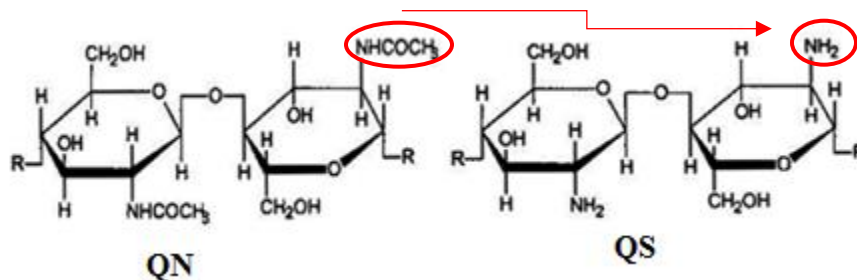


Figura 1.1 Unidad estructural de la QN y QS (Maza, & Hernández 2007).

El QS puede ser degradado *in vivo* por varias proteasas como la lisozima, papaína, pepsina etc (Pangburn *et al.*, 1982). Y su biodegradación conduce a la liberación de oligosacáridos no tóxicos de longitud variable que puede ser posteriormente incorporado a glicosaminoglicanos y glicoproteínas, y a las vías metabólicas. Aranaz *et al.*, (2009) reporta que la cinética de degradación parece estar inversamente relacionada con el grado de cristalinidad, propiedad variable que es controlada principalmente por el DD.

Debido a que el QS es un polímero biodegradable natural, no tóxico, biocompatible y posee un efecto antibacterial, permite ser considerado como una opción viable para su uso y aplicación en regeneración de tejido, por tanto, es importante comprender y controlar el mecanismo y la tasa por la cual se degrada el material. La toxicidad del QS está relacionada con la densidad de carga de la molécula (cantidad de grupos amino) como se muestra en la Figura 1.2, si esta aumenta la toxicidad también será incrementada (Kean & Thanou, 2010).

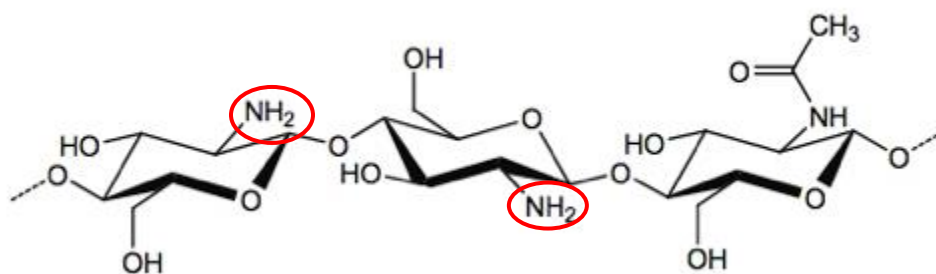


Figura 1.2. Densidad de carga QS.

Estudios microbiológicos establecen un efecto antimicrobiano del QS, debido a la carga positiva en el C-2 del monómero de glucosamina por debajo de pH 6, que actúa sobre la superficie celular microbiana y lleva a la contracción gradual de la membrana celular y finalmente a la muerte de la célula bacteriana.

Se han propuesto varias explicaciones para la actividad antimicrobiana, una de ellas es que la molécula policationica de QS interactúa con los componentes aniónicos predominantes en la pared celular (lipopolisacáridos y proteínas) del microorganismo, que da lugar a la salida intracelular de los componentes debido a los cambios en la permeabilidad de la pared celular; otra teoría es que evita que los nutrientes ingresen a la célula; dado que el QS de bajo peso molecular se une al ADN de la célula microbiana, y de ese modo inhibe el ARN y la síntesis de proteínas (Shahidi *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2007).

La solubilización se produce por la protonación del grupo $-\text{NH}_2$ en el C-2 de la unidad de repetición de D-glucosamina, mediante el cual el polisacárido se convierte en un polielectrolito en medios ácidos como se muestra en la Figura 1.3.

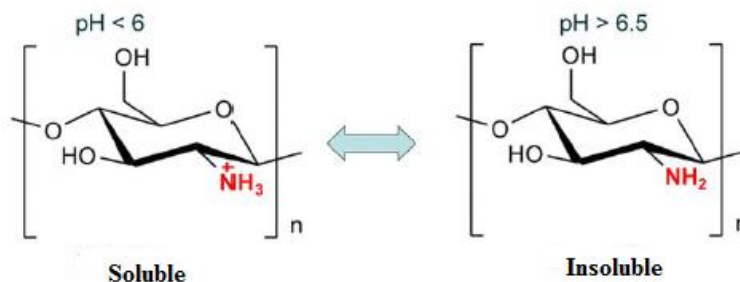


Figura 1.3. Solubilización QS (Kumirska *et al.*, 2011).

La protonación del QS en presencia de ácido acético y ácido clorhídrico muestra que el grado de ionización depende del pH y el pK del ácido. La solubilización del QS con un grado de acetilación (DA) bajo se produce durante un grado de ionización (α) alrededor de 0.5; en HCl, que corresponde a un pH de 4.5-5. Cabe mencionar que el QS es insoluble en agua (pH=7) (Rinaudo, 2006; Kumirska *et al.*, 2011).

El QS es soluble en soluciones ácidas diluidas por debajo de pH 6.0 debido a que el QS puede considerarse una base fuerte y los grupos amino primarios tienen un valor de pKa de 6.3. La presencia de los grupos amino indican que el pH altera sustancialmente el estado de carga y las propiedades del QS. Cuando el pH aumenta por encima de 6 las aminas se desprotonan, ocasionando que el polímero pierda su carga y se convierta en insoluble. La transición entre soluble-insoluble ocurre alrededor de pH entre 6 y 6.5 (Pillai *et al.*, 2009).

Obtención de quitosano

Tradicionalmente, la fuente primaria de QS ha sido la quitina, que a su vez proviene del material residual de la industria pesquera (exoesqueletos de camarón), sin embargo la extracción del polímero se ve limitada, debido a la escasez del material residual en ciertas temporadas del año en tiempos de veda, por esta razón se utilizan fuentes no convencionales como los hongos. El micelio de varias especies de hongos, como en el caso de *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea*, *Rhizopus orizae*, y *Aspergillus niger* han sido empleado como fuente alternativa para la obtención de QS (Wu, 2004).

En la literatura se reportan dos métodos de obtención del QS el químico y el biológico tanto para crustáceos como para hongos (Arbia *et al.*, 2013; New *et al.*, 2010). La obtención del

QS se produce por desacetilación de la quitina y se puede realizar mediante procesos químicos o enzimáticos. Sin embargo, las condiciones específicas de la reacción dependerán de diversos factores, tales como materia prima, tratamiento previo, y el DD deseado.

Método Químico

Método Químico: se puede llevar a cabo de dos formas, homogénea y heterogénea.

- a) La desacetilación homogénea. Consiste en que la QN es suspendida en el álcali y refrigerada con hielo para disolver la QN en la solución. Luego se somete a desacetilación a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente durante períodos largos de tiempo (48-77h) (Takanori *et al.*, 1976). Esto permite que la reacción no se localice en determinados lugares de la cadena y que el ataque a los grupos amida en la molécula acetilada sea más uniforme.

- b) La desacetilación heterogénea. Consiste en que las moléculas de QN son dispersadas en una solución alcalina caliente, generalmente de hidróxido de sodio (concentración de 20-60%). Las condiciones en las que se lleva a cabo la desacetilación heterogénea pueden reducir la longitud de la cadena, por este motivo es conveniente repetir varias veces el tratamiento alcalino por cortos periodos de tiempo (15, 30, 45, 60 y 120 min) y aislando el producto en cada etapa (Methacanon *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que el QS obtenido empleando el proceso heterogéneo presenta variaciones del DD de sus cadenas, el obtenido por vía homogénea tiene la misma composición (García *et al.*, 2008).

Método Enzimático

La ventaja de este método respecto al químico es la obtención de un material uniforme en sus propiedades físicas y químicas. La quitina desacetilasa es la enzima que cataliza la conversión de QN a QS por la desacetilación de los residuos N-acetil-D-glucosamina. La limitación de este método es que la enzima no es muy efectiva en la desacetilación de QN insoluble, y por lo tanto es necesario un pre tratamiento (García *et al.*, 2008).

Obtención de quitosano en hongos método químico

La producción de QS a partir de micelios de hongos tiene mayor ventaja sobre el QS de crustáceos como el grado de acetilación, el peso molecular, la viscosidad, la distribución de carga y una mayor estabilidad con respecto al QS obtenido de los crustáceos. Este último presenta alto peso molecular (aproximadamente 1.5×10^6 Da). Por otra parte el QS producido a partir de micelios fúngicos presenta un peso molecular medio bajo ($1-12 \times 10^4$ Da), y que ha sido utilizado para la absorción de colesterol (Ikeda *et al.*, 1993) y membrana que poseen actividades bactericidas y biológicas (Kittur, *et al.*, 2003), actividad antitumoral (Rao-Chi *et al.*, 2016), y sistemas de suministro de ADN como portador de ADN (Richardson *et al.*, 1999). Por estas razones, hay un creciente interés en la producción de QS a partir de hongos (New *et al.*, 2010).

La pared celular del micelio está compuesta básicamente de polisacáridos y proteínas; entre los polisacáridos destacan la QN y el glucano. Las proteínas generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas. Todos estos componentes están asociados entre sí dando lugar a una estructura rígida (Becerra *et al.*, 2011). La QN se halla formando el complejo quitina-glucano por un enlace glucosídico β (1-3) entre la N-acetilglucosamina y la glucosa Figura 1.4.

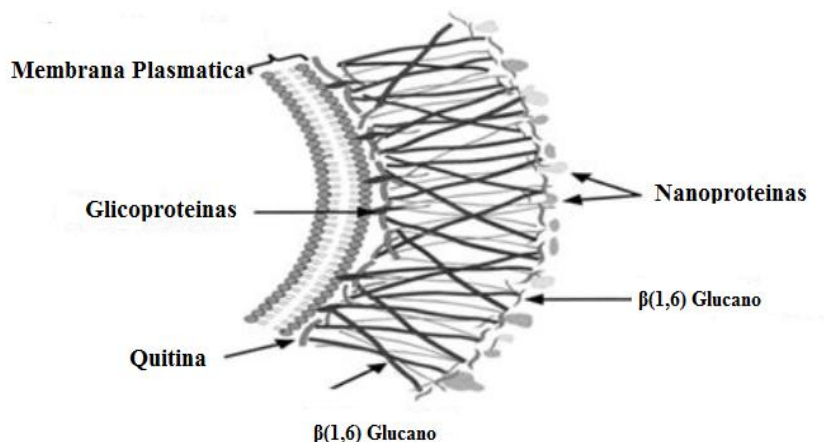


Figura 1.4. Estructura de la pared celular de los hongos (Becerra *et al.*, 2011).

Wessels (1990) propone que inicialmente la QN y cadenas β -glucano se acumulan individualmente en la pared celular de los hongos y forman el enlace del interpolímero Figura 1.5. La formación de la quitina/quitosano-glucano construye cadenas complejas que resultan en una red reticulada rígida en la pared celular causando un problema considerable para la

extracción de QS y glucano por separado. Esta red no se rompe con facilidad en condiciones de extracción suave.

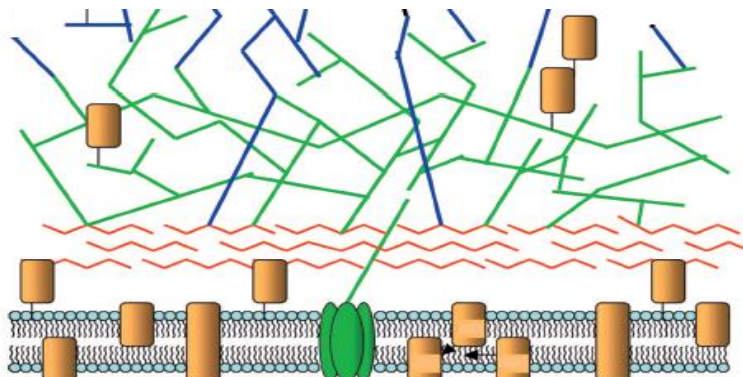


Figura 1.5. Composición de la pared celular Quitina (rojo); β -1,3-D-glucano (verde); β -1,6-D-glucano (azul), las proteínas están representadas por rectángulos de color café (Ponton, 2008).

Para la extracción de QS de la pared celular, primero la pared celular es aislada a partir de la biomasa micelar a través de un tratamiento alcalino con solución diluida de NaOH a temperatura elevada (90-120 ° C), en dicha solución alcalina se disuelven proteínas, lípidos e hidratos de carbono que son solubles en álcali y la pared celular restante es material insoluble con álcali (MIA). Posteriormente, el QS se separa de MIA por disolución en una solución de ácido (por ejemplo ácido acético 2- 10% a 25-95 ° C durante 1-24 h) y finalmente la precipitación de QS fúngico se lleva a cabo mediante el aumento del pH 9-10 y el QS es recuperado por centrifugación (Mohamed *et al.*, 2015).

En la mayoría de los métodos utilizan soluciones 1M NaOH para eliminar proteínas y otros materiales de la pared celular y posteriormente el QS es extraído con ácido acético al 2%. El rendimiento de QS producido a partir de los micelios de hongos tratados de esta manera bajo (44-107 mg/g). En estas condiciones sólo se libera el QS que se encuentra en la pared celular fuera del complejo quitina/quitosano-glucano (New *et al.*, 2010, Pochanavanich & Suntornsuk, 2002). En la Tabla 1.1 se presentan las condiciones para la obtención de QS empleando diferentes variedades de hongos, y empleando el mismo método de extracción; la variación de la eficiencia es debido al uso de distintas concentraciones del medio ácido y alcalino, temperaturas y tiempos, así como también se presenta el valor del rendimiento de extracción del QS.

Tabla 1.1 Extracción de QS de micelios por diferentes métodos (New, *et al.*, 2010).

Referencia	Cepa	Desproteínicación (NaOH)			Extracción Ácido Acético			Rendimiento de Quitosano
		Conc:	Temp:	Tiempo	Conc:	Temp	Tiempo	
Jaworska y Konieczna, 2001	<i>Absidia Orchidis</i>	1M	121°C	10 min	1%	-	-	1.84 g/L
Crestini <i>et al.</i> , 1996	<i>Lentunula Edodes</i>	1M	121°C	15 min	2%	95°C	14 h	6.18 g/Kg de paja de trigo
Crestini <i>et al.</i> , 1996	<i>LentunulaEdodes</i>	1M	121°C	15min	2%	95°C	14 h	120 mg/L
Tan <i>et al.</i> , 1996	<i>G. Butleri</i>	1M	121°C	15 min	2%	25 °C	1h	476 mg/L
Muzzarrelli <i>et al.</i> , 1994	<i>A. Coerulea</i>	25%	Hervir	3 h	0.1 %	25°C	16 h	1800 mg/L
Rane y Hoover, 1993	<i>A. Coerulea</i>	1M	121°C	15 min	2%	95°C	12 h	480 mg/L
Hang, 1990	<i>R. Oryzae</i>	2%	121°C	15 min	2%	95%	12 h	700 mg/h

Grado de desacetilación quitosano

Uno de los parámetros más importantes de caracterización para determinar el tipo de biopolímero que se obtiene es su DD, lo que permitiría identificar la eficiencia del proceso de desacetilación y la obtención de QS. Se han utilizado varias técnicas de identificación del DD como: valoración potenciométrica, espectroscopia infrarroja, análisis elemental CHN, UV-Vis, ¹H RMN y titulación conductimétrica (Kumirska *et al.*, 2010), dado que este parámetro es importante para determinar el tipo de biopolímero extraído QS o QN.

Valoración potenciométrica quitosano

La valoración potenciométrica, por su parte, consiste en disolver el QS en un exceso de ácido clorhídrico (HCl) para que ocurra la protonación del grupo amino libre del QS y luego realizar una valoración con hidróxido de sodio (NaOH) hasta que el pH de la solución se estabilice; este procedimiento permite obtener una curva de titulación del QS, la cual ha de presentar dos puntos de inflexión, y la diferencia entre estos proporciona la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del QS. La concentración de los grupos amino se puede determinar mediante la ecuación 1.1 (Escobar *et al.*, 2013), La representación gráfica muestra en la Figura 1.6.

$$\% NH_2 = \frac{16.1 * (y - x)}{w} f \quad ec. 1.1$$

Dónde: y es el punto de inflexión mayor y x el menor (expresados como volúmenes).

f es la molaridad de la solución de NaOH.

w es la masa en gramos de la muestra.

Y la constante 16.1 se refiere a un valor relacionado al peso del grupo amino.

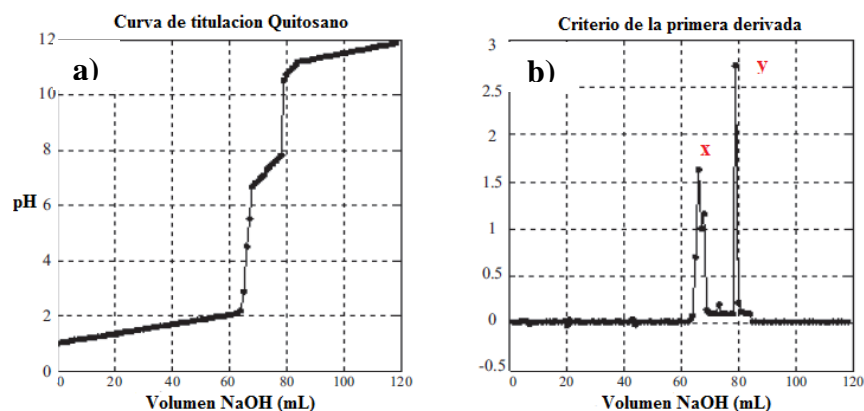


Figura 1.6. Curva de titulación QS extraído de *Ganoderma lucidum* (a) y criterio de la primera derivada (b) (Escobar *et al.*, 2013).

Espectroscopia infrarroja (IR)

La Espectroscopia infrarroja (IR) es una de las técnicas analíticas más importantes y ampliamente utilizada, se basa en conocer las vibraciones de los átomos de la molécula. El espectro infrarrojo comúnmente se obtiene al pasar la radiación electromagnética infrarroja a través de una muestra que posee un momento dipolar permanente o inducido y determinar qué fracción de la radiación incidente es absorbida en una energía particular. La energía de cada pico en un espectro de absorción y corresponde a la frecuencia de vibración de una parte de la molécula, permitiendo así la identificación cualitativa de ciertos grupos funcionales en la muestra. Un espectrómetro de infrarrojo por lo general registra la energía de la radiación electromagnética que se transmite a través de una muestra como una función del número de onda o frecuencia. Hoy en día, el espectro total se analiza mediante un proceso de interferencia, a la que se le aplica la operación matemática de transformada de Fourier para obtener el espectro. La espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) ha mejorado dramáticamente la calidad de los espectros de infrarrojos y minimiza el tiempo requerido para obtener datos. Los espectros de FTIR del QS se registran por lo general en el infrarrojo medio (4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}) (Kumirska *et al.*, 2010).

El grado de N-acetilación (DA) del QS puede determinarse según Kasaai, (2008) mediante técnicas de IR considerando los siguientes parámetros:

- La determinación de la relación A_M/A_R , donde A_M es la intensidad de una banda característica, que es una medida de N-acetil o el contenido de amina; y A_R es la intensidad de una banda de referencia, que tiene una intensidad que no cambia con el DA. Al comparar los valores de A_M/A_R de una muestra esta permitirá identificar su grado de DA.
- La creación de una curva de calibración trazando la relación de absorción de muestras de QN/QS de DA de muestras conocidas, permitirá ser la referencia para la determinación del valor del DA, de una muestra en estudio.
- Evaluación estadística de varias relaciones de banda de absorción.

De manera general los métodos de espectroscopia incluyen elegir una banda característica adecuada (que es la intensidad de una banda medida de N-acetilo o el contenido de amina), elegir una apropiada banda de referencia (que tiene una intensidad que no cambia con el DA) y dibujar una línea base, debido a que tiene un efecto considerable en la estimación de los valores del grado de acetilación (DA). También se necesita una calibración frente a una técnica absoluta.

Para la identificación de una banda característica y una de referencia (Brugnerotto *et al.*, 2001) es preciso comparar los espectros IR de las dos moléculas que representan las unidades de repetición de la QN (N-acetilglucosamina) y el QS (glucosamina).

Al comparar ambos espectros, se podría apreciar que una banda característica aparece en 1320 cm^{-1} para N-acetilglucosamina, como banda de referencia dos posibles bandas a 3450 cm^{-1} y 1420 cm^{-1} (grupos $-\text{OH}$ y CH_3 respectivamente). Para elaborar las curvas de calibración, se traza las relaciones de adsorción (banda característica/banda de referencia) de muestras de QN y QS, frente a su DA mediante las siguientes correlaciones entre los valores experimentales de DA y las relaciones de absorbancia A_{1320}/A_{3450} y A_{1320}/A_{1420} , expresa por la ecuación 1.2 y 1.3.

$$A_{1320}/A_{3450} = 0.03146 + 0.00226 \times DA \quad r = 0.97036 \quad \text{ec. 1.2}$$

$$A_{1320}/A_{1420} = 0.3822 + 0.03133 \times DA \quad r = 0.99042 \quad \text{ec. 1.3}$$

La relación entre las variables (Relación de bandas de absorción frente DA se basa en el supuesto de que la dependencia es lineal. Por consiguiente uno tiene que calcular los coeficientes de regresión; A ; y B de la ecuación 1.4 para predecir la DA.

$$y = B + A \times DA \quad \text{ec. 1.4}$$

Un coeficiente de correlación, R , proporciona una manera cuantitativa para expresar el grado de asociación existente entre las dos variables. El propósito para determinar el coeficiente de correlación es evaluar la fiabilidad de los instrumentos IR que miden la absorción de bandas características y de referencia. Un alto coeficiente de correlación significa gran fiabilidad y bajo coeficiente de correlación baja confiabilidad.

Esta curva de calibración se emplea para convertir una relación de absorción a un valor DA. También se utiliza para verificar y validar los resultados experimentales. Si los puntos experimentales se encuentran cerca de la línea de calibración, esto indica que los resultados experimentales están en concordancia con los datos de referencia y la técnica es por lo tanto validada (Kasaai, 2008).

Baxter (1992), propone las relaciones de bandas A_{1655}/A_{3450} , y toma como línea base la comprendida entre los 4000 cm^{-1} para la banda A_{3450} correspondiente al grupo OH del QS y entre 1800 cm^{-1} y los 1600 cm^{-1} para la banda de absorción en los 1655 cm^{-1} correspondiente a la amida I. El grado de acetilación se obtiene a través de la ecuación 1.5.

$$DA(\%) = (A_{1655}/A_{3450}) \times 115 \quad \text{ec. 1.5}$$

Esta ecuación se utiliza para muestras con grado de acetilación entre 0 y 55%. Sin embargo; cuando se trabaja con muestras que presentan un alto grado de acetilación pierde precisión, debido a la absorción de la amida I en 1655 cm^{-1} es una mezcla de dos componentes: una centrada en 1655 cm^{-1} con una línea base entre $1800\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$ y para la banda de absorción a 1630 cm^{-1} una línea base entre 1650 y 1600 cm^{-1} . En este caso el DA se calcula mediante la ecuación 1.6 (Hernández, 2004).

$$DA(\%) = [(A_{1655}/A_{3450}) + (A_{1630}/A_{3450}) - 0.13] \times 85.5 \quad \text{ec. 1.6}$$

Los resultados mediante esta ecuación presentan una buena correlación con los obtenidos mediante resonancia magnética nuclear (RMN) para un grado de acetilación entre 0 y 100 % (Hernández, 2004).

Shigemasa (1996) propone evaluar como banda característica 1655 correspondiente a la amida I y como banda de referencia 3450 estiramiento de enlaces O-H, 1070 y 1030 estiramiento C-O. Al evaluar la relación A_{1655}/A_{3450} contra su DD no tenía una relación lineal en la región de bajos DD y las relaciones de A_{1655}/A_{1070} y A_{1655}/A_{1030} contra DD no mostraron una relación lineal, debido a la separación de la banda de amida I.

Dong (2001) proponen evaluar cuatro bandas características 1655 Amida I, 1560 Amida II, 1380 deformación simétrica de CH_3 y flexión de CH y 1320 Amida III cm^{-1} , ocho bandas de referencia 3430 estiramiento del enlace O-H, 2920 estiramiento asimétrico de CH_2 y estiramiento simétrico de CH_3 , 2880 estiramiento C-H, 1425 flexión de CH_2 y deformación de CH_3 , 1155 puente asimétrico del estiramiento de oxígeno, 1070 estiramiento C-O, 1030 estiramiento C-O y 895 estiramiento del anillo, también utiliza el método de línea base, donde se utilizaron las bandas características de 1655 y 1560 cm^{-1} y como bandas de referencia las antes mencionadas Tabla 1.2.

En la Tabla 1.2 se muestran los coeficientes de correlación de las distintas relaciones banda característica/banda de prueba (A_M/A_R) trazados con sus correspondientes DD.

Tabla 1.2. Coeficientes de correlación de la relación A_M/A_R vs DD (Dong *et al.*, 2001).

Bandas cm^{-1}	Características								
		3430	2920	2880	1425	1155	1070	1030	895
Referencia	1655	0.9721	0.9749	0.9710	0.9348	0.8237	0.6963	0.6285	0.8418
	1560	0.9728	0.9837	0.9818	0.9543	0.8954	0.8521	0.8249	0.8895
	1380	0.8430	0.9343	0.9206	0.8908	0.4851	0.1010	0.3312	0.7989
	1320	0.8997	0.9585	0.9535	0.9542	0.7330	0.3583	0.2406	0.8902

Nanotecnología

Los materiales nanotecnológicos están ganando terreno en la última década debido a sus amplias aplicaciones en la industria farmacéutica, catálisis, sensores, bioingeniería y

aplicaciones medio ambientales. Estos materiales poseen propiedades de superficie como alta permeabilidad, alta relación de superficie/volumen y diámetro de fibra pequeño (Babitha *et al.*, 2017).

Existen diferentes tipos de estructuras que se pueden obtener a escala nanométrica, como nanotubos, nanoesferas, nanopartículas, nanofibras, etc, cuya morfología depende del proceso de obtención. Sus aplicaciones se determinan por las propiedades mecánicas y químicas que presentan, como es su elasticidad, dureza, capacidad de romperse, conductividad entre otras. (Díaz del Castillo Rodríguez, 2012).

Una de las soluciones que ha proporcionado la Nanotecnología, ha sido el mejorar la biodisponibilidad e incorporación de compuesto poco hidrosolubles o liposolubles, como es el caso de algunos compuestos activos medicinales (QS, astaxantina, indometacina) al ser encapsulados (Grant *et al.*, 2011).

Son diversos los trabajos publicados en Nanotecnología (Grant *et al.*, 2011, Roberts *et al.*, 2013) para la obtención de nanodispersiones, logrando con éxito que compuestos poco hidrosolubles encapsulados en micro y nanoesferas queden dispersas en sistemas acuosos. Se ha empleado el desarrollo de estructuras como nanotubos o nanofibras donde se logre encapsular compuestos activos es de reciente interés debido al abanico de posibles aplicaciones de estas estructuras en la industria (Navideh *et al.*, 2014).

Dentro de las aplicaciones en el campo de la Farmacología y el desarrollo de nanomateriales, está la obtención de fibras de biopolímeros que encapsulen y protejan moléculas o compuesto activos utilizados de forma terapéutica en el tratamiento tópico de enfermedades, en la recuperación de lesiones cutáneas, o simplemente para el mejoramiento en las condiciones de la piel (Gamboa, Mantilla, & Castillo, 2007). Pero existe la desventaja que la gran mayoría de estos compuestos son susceptibles al pH, la oxidación, el tratamiento térmico o químico. Desde el punto de vista del proceso de encapsulación diversas técnicas son usadas en la industria como la coacervación, técnica para la producción de sistemas de administración basados en carbohidratos, permitiendo que un compuesto bioactivo quede atrapado dentro de una partícula formada por complejación electrostática de carga positiva (QS) y una carga negativa (pectina y alginato) biopolímeros (coacervación compleja) (Fathia *et al.*, 2014).

Otro método reportado es el secado por aspersión, técnica que se basa en disolver o dispersar el ingrediente activo en la solución del biopolímero. La dispersión se atomiza en una cámara de aire caliente, que elimina rápidamente el disolvente y produce una partícula seca con el ingrediente activo encapsulado. Este método tiene algunas limitaciones para bioactivos volátiles o termo-sensibles, debido a la alta temperatura usada en este proceso (Yeo *et al.*, 2001).

Y finalmente el electrohilado, técnica que ha ganado mayor interés como una técnica para la fabricación de fibras continuas con diámetros de posibles nanómetros que podrían aplicarse para la protección y liberación de compuestos bioactivos Figura 1.7.

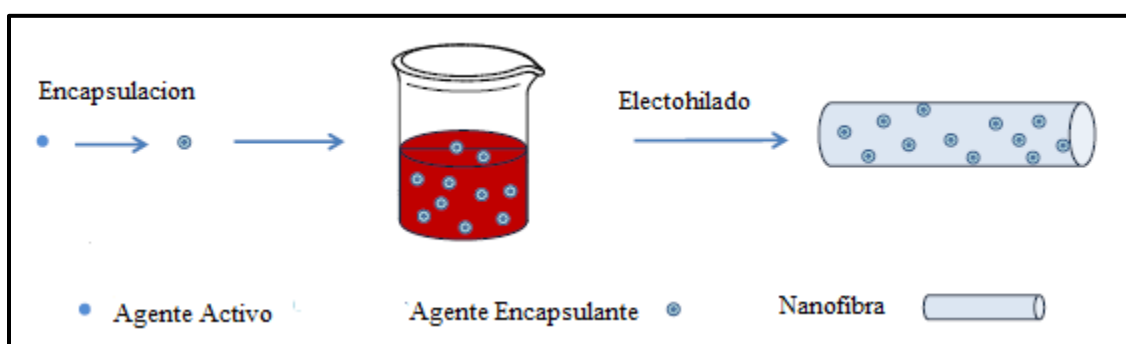


Figura 1.7. Encapsulación de QS y PVA (Haider *et al.*, 2015).

Actualmente son pocos los mecanismos que logran producir estos materiales de forma segura, eficiente y económica, pudiendo dar respuesta a la necesidad de suministrar estos compuestos de manera controlada. El proceso de electrohilado ha permitido la obtención de fibras con diámetros nanométricos, que encapsulan proteínas, antibióticos, aceites esenciales, etc. prometiendo ser una respuesta viable a las necesidades antes planteadas (Loera *et al.*, 2012).

Técnica de Electrohilado

El electrohilado es uno de los métodos de obtención de nanofibras, y fue inventada por Formhals en 1934 y en los últimos 10 años ha sido la técnica más utilizada para la producción de nanofibras (Cano *et al.*, 2010).

Actualmente, hay dos configuraciones estándar de electrohilado, vertical y horizontal como se muestra en la Figura 1.8. El principal inconveniente al trabajar en posición vertical es la posible salida de gotas de solución desde el capilar hacia el plato colector las cuales pueden

caer sobre las fibras depositadas haciendo defectuosa la superficie de las mismas e interrumpiendo el proceso (Nandana *et al.*, 2010).

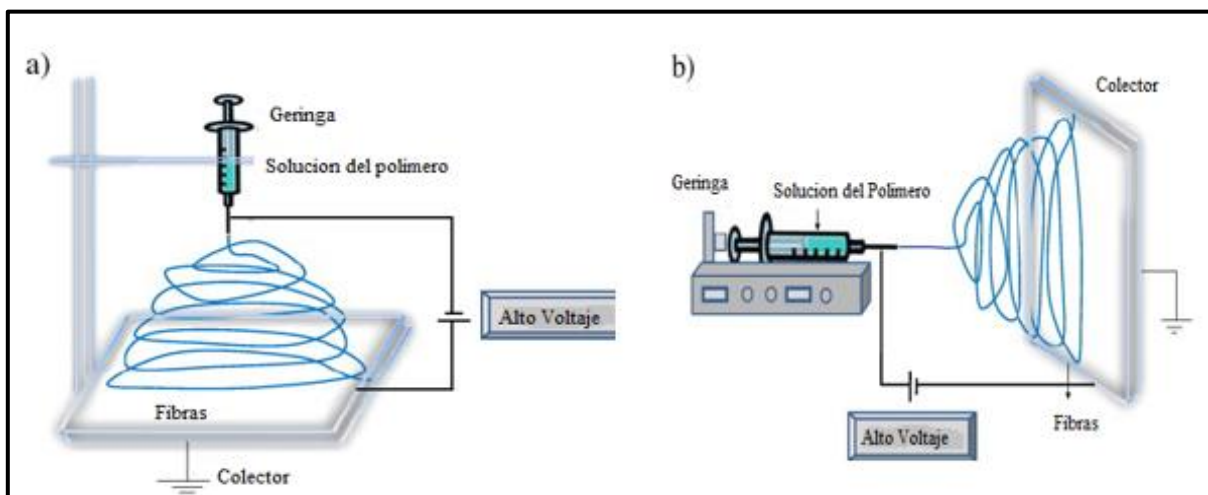


Figura 1.8. Representación esquemática de electrohilado a) vertical b) horizontal (Nandana *et al.*, 2010).

La técnica de electrohilado consiste en una fuente de alimentación de alta tensión, una aguja conectada a la jeringa, y un colector de metal, donde un diferencial de potencial eléctrico se aplica entre la aguja y el colector metálico conectado a tierra. Inicialmente, la solución del polímero se mantiene en la punta de la aguja debido a la tensión superficial y cuando el potencial eléctrico se intensifica, la superficie semiesférica de la solución de polímero en la punta de la aguja se alarga para formar una forma cónica conocida como: cono de Taylor como se muestra en la Figura 1.9. Un aumento adicional del campo eléctrico provoca la formación de un chorro de polímero cuando la fuerza electrostática de repulsión supera la tensión superficial. En este punto, un chorro de polímero es expulsado de la punta del cono de Taylor y se desplaza rápidamente al colector de metal. Antes de llegar al colector, el chorro se somete a una serie de inestabilidades de flexión accionados eléctricamente y se adelgaza gradualmente en el aire debido a la elongación y evaporación del disolvente. El chorro cargado finalmente se recoge en un colector (Figura. 1.9 B) y se convierte en nanofibras orientadas al azar en la forma de una tela no tejida. Las nanofibras alineadas pueden ser fabricadas utilizando un colector estacionario con pequeños cambios en el colector o en diferentes colectores dinámicos (Jiang, Carbone & Lo, 2015). En una configuración como se

muestra en la (Figura 1.9 D), se usa un colector de tambor giratorio a una velocidad alta para obtener nanofibras alineadas Figura 1.9 E.

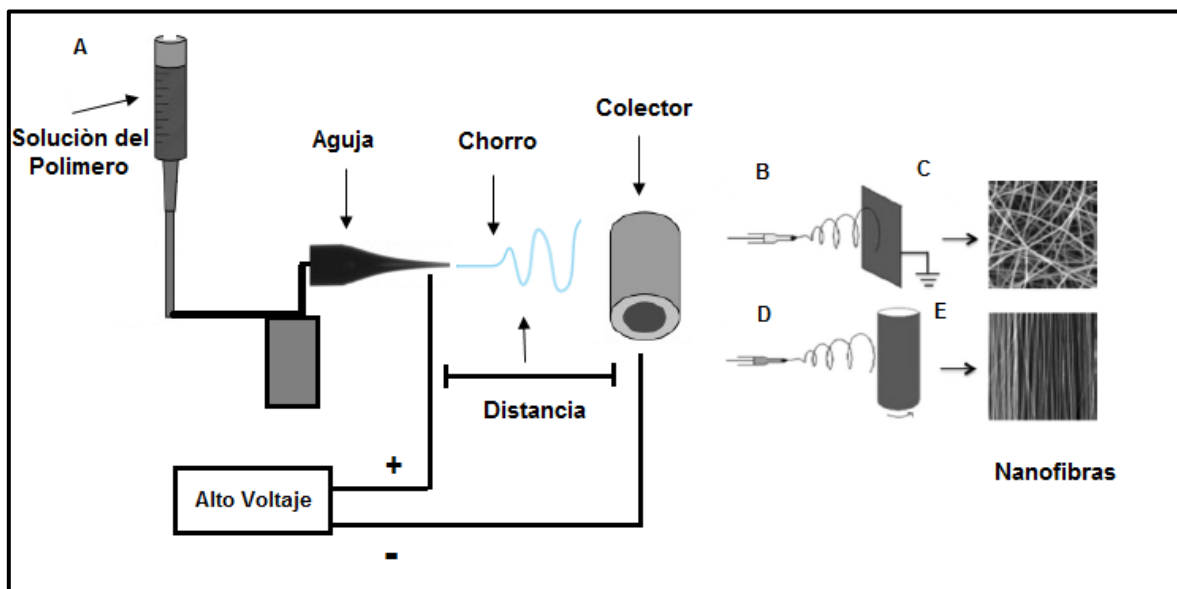


Figura 1.9. (A) Diagrama esquemático del proceso de electrohilado. (B) Colector metálico estacionario. (C) Nanofibras orientadas al azar recogidas en el recolector estacionario. (D) Colector de tambor giratorio. (E) Nanofibras alineadas uniaxialmente recogidas en el colector de tambor giratorio (Jiang, Carbone, & Lo, 2015).

Existen varias variables que afectan el proceso de electrohilado y las características de las fibras, entre ellas el voltaje aplicado (Elsabee *et al.*, 2012), la tasa de flujo de la solución (Megelski *et al.*, 2002), distancia capilar colector (Matabola *et al.*, 2013), volatilidad de disolvente (Kanani *et al.*, 2011), concentración de polímero (Haider *et al.*, 2013), conductividad de la solución, así como el comportamiento pseudoplástico del material a electrohilar (Haider *et al.*, 2015).

En la Tabla 1.3, se resumen los efectos en las características de los materiales respecto a los cambios en las variables y parámetros más importantes en el proceso de electrohilado.

Tabla 1.3. Parámetros que influyen en el proceso de electrohilado.

Variable	Parámetro	Efecto
Solución	Concentración	El aumento en la concentración eleva la viscosidad de la solución y por consecuencia el diámetro de la fibra. Por el contrario si la solución es poco concentrada, esta rompe en gotas y no forma la fibra
	Tensión superficial	Depende del polímero y del disolvente, al ir reduciéndose se disminuye la posibilidad de formación de gotas.
	Conductividad	Experimentalmente se ha demostrado que al aumento de la conductividad se disminuye el diámetro de la fibra.
	Efecto dieléctrico del disolvente	Cuando se cuenta con constantes dieléctrica elevada, se reduce la posibilidad de generar gotas en las fibras y el diámetro de estas disminuye.
Proceso	Voltaje	Un alto voltaje favorece la formación de fibras más delgadas y evita la formación de gotas.
	Flujo de salida	Un bajo flujo de salida permite que se genere el cono de Taylor en el sistema, logrando que se evapore el solvente de forma gradual, evitando la formación de defectos en la fibra. Al aumentarse el flujo de salida, el diámetro de la fibra también se eleva.
	Distancia Inyector vs. Colector	Está ligada a las propiedades de la solución, y debe determinarse una distancia ideal, ni muy cerca o muy lejos que origine la formación de gotas.
	Humedad	Al aumentarse la humedad se favorece la existencia de poros circulares en la superficie de las fibras.

(Marcela, Sánchez, Rodríguez & López, 2014)

Diferentes estructuras de nanofibras ya han sido producidos por esta tecnología usando polímeros naturales, tales como colágeno, fibroína seda, policaprolactona polilactidas y quitosano (Pinho *et al.*, 2009). Este último material es un biopolímero con mayor uso en investigaciones relacionadas con la ingeniería de tejido, por su biocompatibilidad, biodegradabilidad, aceleración en la formación de osteoblastos, hemostático, fungistático además de que se metaboliza por ciertas enzimas humanas, tales como la lisozima y tiene similitudes estructurales con glicosaminoglicanos, importantes en la reparación de heridas (Shirai *et al.*, 2011). Las propiedades biológicas asociadas con nanofibras que contienen QS se muestran en la Tabla 1.4 (Balagangadharan *et al.*, 2016).

Tabla 1.4. Propiedades de las nanofibras a base de QS (Balagangadharan *et al.*, 2016).

Quitosano/polímeros sintéticos	Biocompatibilidad	La adhesión celular y proliferación	Degradación
Policaprolactona	+	-	±
Poli (ácido láctico-co glicólico)	+	-	-
Tereftalato de polietileno	+	+	-
Poli(L-ácido Láctico)	+	-	-
Alcohol polivinílico	+	+	-

+: Favorece el proceso -: Inhibe el proceso

Las propiedades de las fibras obtenidas por electrohilado han recibido una gran atención por parte de la comunidad científica como candidatos adecuados para aplicaciones de ingeniería y administración de fármacos biomédicos. Sus propiedades incluyen, alta relación de superficie/volumen, de alta porosidad, tamaño de poro ajustable y similitud morfológica a la matriz extracelular (ME). (Ahmed & Ikram, 2016). Diversas metodologías se han reportado para la fabricación de nanofibras empleando QS/PVA como se muestra en la Tabla 1.5.

Tabla 1.5. Metodologías de Electrohilado QS/PVA.

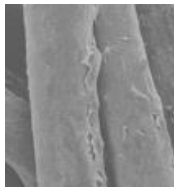
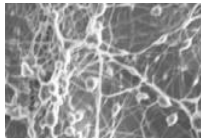
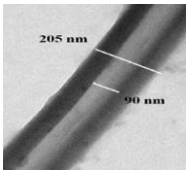
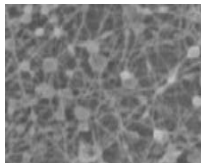

Tipo de metodología	Polímeros y Concentraciones empleadas	Condiciones de electrohilado	Conformación de electrohilado usado
(Çay, Miraftab, & Akçakoca, 2014)	PVA PM: 146000-186000 g/mol y (98-99% hidrolizado) QS: PM Medio 200-800 DD (75-85% de desacetilación). Solución de PVA al 8% y una solución QS 2% utilizando una solución de ácido acético al 2% para solubilizar el QS Relaciones PVA / QS: 100/0, 75/25 y 50 /50	Voltaje de 18 kV Distancia, punta la aguja al colector de 12 cm. Velocidad alimentación de 0.5 mL /h. Colector de metal cubierta.	Obtuvieron nanofibras libres de gotas mediante una mezcla de 75/25 PVA / QS con diámetros de nanofibra inferiores (200.28 nm) en comparación con las nanofibras de PVA puro (301.33). Por otra parte, el aumento en la proporción de QS en la mezcla inhibió la formación de fibras regulares debido a una mayor viscosidad y conductividad
(Roya <i>et al.</i>, 2016)	PVA: PM 72 KDa grado de hidrolisis 98%. QS: PM 127 KDa y 97% de desacetilación. Solución QS al 2% se preparó disolviendo polvo de QS en una mezcla de ácido acético / agua (1/9 p/p) que fue mezclada con soluciones acuosas de PVA (5 - 8%) p/p en una relación 1:1.	Voltaje de 22 kV Distancia de 14 cm. Velocidad de flujo a 0.6 mL / h.	Evaluaron el efecto de la concentración de la solución sobre la morfología y el diámetro de las nanofibras, se utilizaron concentraciones de PVA (5-8% en peso). A mayor concentración de QS (más del 2% en peso), se presentó flujo discontinuo y nanofibras no uniformes. Por lo tanto, la concentración de QS se fijó al 2 %.
Koosha, M., Mirzadeh, H. (2015)	PVA: PM: 89000-98000 g/mol, grado de hidrolisis 99% QS: 88 % desacetilación. Solución al 7% en peso de QS disuelto en ácido acético, y solución de PVA 7%, QS y PVA fueron mezclada Relaciones de volumen QS/ PVA de 0/100, 30/70, 50/50, 70/30 y 100/0.	Voltaje de 20 kV Velocidad de rotación de 700 rpm Velocidad de flujo a 0.5 mL / h.	Las relaciones 50/50 y 70/30 tenían un bajo rendimiento de electrohilado .En comparación con 0/100 y 30/70 tuvieron un mejor rendimiento y espesor apropiado (257±63 nm y 223±50 nm respectivamente).

(Biazar <i>et al.</i>, 2015)	PVA: PM 85000-12400 hidrolizado al 96 %. QS Conchas de camarón \geq 75% desacetilación. La solución PVA / QS se disolvió en ácido acético, con una relación 80:20 en ácido acético al 2%. Solución de PVA al 5%, T=75°C t= 1.5 h.	Voltaje de 21-25 kV Distancia de 10 cm.	Las fibras PVA / QS electrohiladas tenían diámetros de 150 nm aproximadamente. La adición de QS a PVA mejora la viabilidad y la proliferación de las células de fibroblastos.
(Paipitak, Pornpra, Mongkotalang, Techitdheera, & Pcharapa, 2011)	PVA: PM 85000-12400 hidrolizado al 96 %. QS: (Conchas de camarón \geq 75% desacetilación). La solución PVA / QS se disolvió en ácido acético, empleando una relación 80:20 en ácido acético al 2%. Solución de PVA se varió del 3-5% en peso. T=75°C, t= 1.5 h.	Voltaje de 21-25 kV Distancia de 10 cm.	La concentración adecuada de la solución para la formación de fibra fue 5% en peso, el diámetro de la fibra nanocompuesta de PVA / QS preparada fue de aproximadamente 100 nm.

Nanofibras

Las nanofibras se encuentran definidas como estructuras cilíndricas que se originan a partir de polímeros, con propiedades mecánicas superiores en comparación con otras formas. En la Tabla 1.6 se muestran los diferentes tipos de nanofibras obtenidas por la técnica de electrohilado.

Tabla 1.6. Clasificación y características de micro y nanofibras obtenidas por electrohilado.

Tipo de Fibra	Parámetros Involucrados	Forma
Aplanadas	Se atribuyen a la formación de una capa de polímero en la superficie de la fibra, debido a la desigual evaporación del disolvente, la presión atmosférica tiende a colapsar la forma redonda de la fibra. Puede estar relacionada con el tipo de disolvente y la adición de sales a la solución (Kang <i>et al.</i> , 2010).	
Ramificadas	Se relacionan con la aparición de pequeños chorros en la superficie del primer chorro. La inestabilidad entre las fuerzas eléctricas y la tensión superficial generan inestabilidad del chorro(Koombhongse <i>et al.</i> , 2001)	
Huecas	Es posible obtener este tipo de fibras por medio de electrohilado coaxial o por procesos químicos en las fibras electrohiladas (Pakravan <i>et al.</i> , 2012).	
Fibras con gotas	Los principales parámetros asociados con la formación de gotas en el proceso son la tensión superficial y las propiedades viscoelásticas de la solución. Flujo de salida, distancia entre el capilar y el plato colector, voltaje, peso molecular, viscosidad de la solución, pueden promover la formación de este tipo de defectos (Fong <i>et al.</i> , 1999).	
Fibras con poros	Humedad relativa y presión de vapor del disolvente contribuye a la aparición de poros en la superficie de las fibras (Bognitzki <i>et al.</i> , 2001).	

Cada vez se están desarrollando materiales compuestos que utilizan materiales basados en polímeros naturales y sintéticos diseñados para mejorar no sólo las propiedades físicas y químicas sino también para mejorar el rendimiento biológico. El agente hilador en el presente trabajo es el alcohol polivinílico (PVA) y la principal razón es que ambos polímeros son biocompatibles (Pinho *et al.*, 2009)

Material encapsulante PVA

El PVA es un polímero sintético de gran flexibilidad y resistencia, proveniente de la hidrólisis controlada del poli (acetato de vinilo) cuya estructura se muestra en la Figura 1.10. Su principal uso se encuentra en la industria de adhesivos, pinturas, y como coloide protector en polimerización en emulsión, aunque también se aplica frecuentemente en las industrias textil y farmacéutica (Puppi *et al.*, 2011). El PVA se utiliza ampliamente en aplicaciones biomédicas debido a sus características conocidas de biocompatibilidad, biodegradabilidad, solubilidad en agua, no toxicidad, capacidad de hinchamiento en un medio acuoso, y las propiedades mecánicas variables (Jalvandi *et al.*, 2017). Dependiendo de la cantidad de grupos acetato del PVA que sean hidrolizados, el PVA se clasifica comercialmente de: alta (~99%), media (~88%) y baja (~78%) hidrólisis, siendo este el porcentaje molar de unidades repetitivas con grupos hidroxilo en el monómero representativo de la cadena. El grado de hidrólisis es quizás la propiedad más importante del PVA ya que define su solubilidad en agua y su actividad superficial (Barrera *et al.*, 2007) y esta última propiedad es fundamental para su uso en la industria biomédica, ya que el proceso degradativo del PVA se ve afectado por el grado de hidrólisis, la cristalinidad y el peso molecular del polímero. (Puppi *et al.*, 2011).

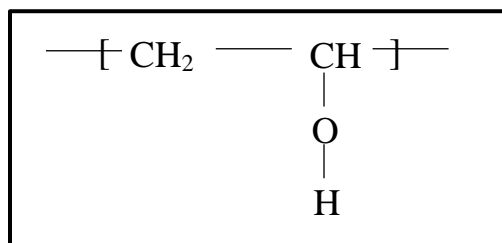


Figura 1.10. Estructura del PVA.

El alcohol polivinílico es elegido por dos razones:

(i) PVA interactúa fuertemente con QS a través de enlaces de hidrógeno en un nivel molecular.

(ii) PVA puede ser electrohilado en un medio acuoso (Ohkawa *et al.*, 2004).

Solvente Ácido Acético

El disolvente utilizado en la preparación de las soluciones del polímero a electrohilar tiene una influencia significativa en su capacidad de hilatura, debido a que el primero y más importante paso en el proceso de electrohilado es la disolución de polímero en un disolvente adecuado. Los disolventes deben tener propiedades como, volátilidad, alta presión de vapor del disolvente, bajo punto de ebullición, alta conductividad, baja viscosidad, entre otros parámetros (Zhang *et al.*, 2002). Básicamente, un disolvente, desempeña dos funciones en el proceso de electrohilado: en primer lugar disolver las moléculas del polímero y obtener la solución a electrohilar y en segundo lugar llevar a las moléculas de polímero disueltas hacia el colector, tras la evaporación de disolvente de la punta de la aguja al colector para recolectar las fibras (Ohkawa *et al.*, 2004). Son diversos los disolventes que se han utilizado para el electrohilado de QS (ácido clorhídrico diluido, ácido acético, ácido fórmico puro, ácido dicloroacético y el ácido trifluoroacético), sin embargo el mayor utilizado es el ácido acético, sus propiedades se muestran en Tabla 1.7.

Tabla 1.7. Propiedades del ácido acético

Disolvente	Tensión superficial (mN / m)	Constante dieléctrica	Punto de ebullición (° C)	Densidad (g / ml)
Ácido Acético	22.3	33	64.5	0.791

De acuerdo a la información presentada con anterioridad el QS es un polímero con propiedades (biodegradable, biocompatible, no toxico, hemostático y antimicrobial) no obstante presenta dificultad para solubilizarse en mezclas hidrosolubles así también como su costo de purificación y extracción.

Existen varias empresas que comercializan el QS a partir de crustáceos no obstante su costo es alto aproximadamente 8000/50gr (160 pesos por gr) implicando un proceso de extracción y purificación con solventes y con ello un costo ambiental importante, por ello se desarrolló un proceso de extracción de QS a partir de fuentes vegetales que implica un menor costo ambiental el proceso para la obtención de micro y nanofibras de QS obtenido del hongo *Pleurotus ostreatus* empleando el método de electrohilado, con PVA como material de recubrimiento.

Capítulo 2

Metodología

Obtención de quitosano

Para el presente estudio las setas *Pleurotus ostreatus* se adquirieron en el mes de agosto de 2017 en la empresa "Setas del bosque, S del R.L." de la ciudad de Puebla. Posteriormente se almacenaron en refrigeración a 5°C durante 2 días, y se procedió con la metodología propuesta por Nwe *et al.*, (2010) Figura 2.1. Este proceso consiste en una etapa de pretratamiento y extracción del QS misma que se describe enseguida:

Etapa de pretratamiento

Troceado del hongo seta, cuyo objetivo fue la reducción de tamaño para facilitar la extracción del QS, seguido de un proceso de secado convectivo, en el cual las muestras fueron colocadas en un horno marca *Lumistell* modelo HTP-72 a una temperatura 50-53°C hasta obtener un peso constante. El tiempo requerido para secado fue de 11 horas.

Después las muestras deshidratadas fueron molidas en una licuadora convencional (Osterizer Modelo 50, México) hasta obtener un polvo seco y su posterior tamizado, para esta operación el polvo obtenido se hizo pasar por un tamiz de malla 40.

El proceso de extracción del QS

Este proceso consistió en la extracción y desacetilación de la quitina, se pesaron 43 g del polvo del hongo tamizado, que fueron transferidos en un matraz de bola de 5 L provisto de una barra magnética para agitación. Posteriormente se adicionó una solución de NaOH al 3 M en una relación de 5 ml de solución por cada gramo de polvo de hongo. Dicha mezcla se mantuvo a 45 °C y agitación de 100 rpm de manera continua por 8 horas.

Proceso de Filtración y lavado

Para eliminar los residuos de NaOH de la pasta resultante y alcanzar un pH cercano a la neutralidad, se realizaron cinco lavados con agua desionizada, hasta alcanzar un pH de 7.8.

Solubilización del QS

Una vez neutralizada la pasta del hongo esta fue pesada (100 g), y trasferida a un matraz de bola de 5 L provisto de una barra magnética para agitación. La pasta se mezcló con una solución acuosa de CH_3COOH 0.35 M en una relación 5 ml de solución por cada gramo de pasta. Posteriormente esta mezcla fue sometida a agitación de 50 rpm a 95°C durante 3 h. Dicha mezcla se dejó en reposo durante un tiempo aproximado de 17 horas.

Dado que el QS se encontró en la fase líquida se procedió a filtrar la mezcla resultante, el sobrenadante se vertió en un vaso de precipitados de 1 L y se agregó una solución de NaOH 1 M (500 mL de sobrenadantes/136 mL solución de NaOH) para la precipitación del QS.

Para la recuperación del QS precipitado se llevó a cabo un proceso de filtrado y la torta recuperada fue lavada con agua desionizada hasta alcanzar un pH de 7.8, la torta se secó en una estufa de convección a temperatura de 60°C durante 6 h. En la Figura 2.1 se presenta el Diagrama de bloques para la obtención de QS de *Pleurotus ostreatus*.

Identificación del polímero.

Una vez extraído el biopolímero, se prepararon muestras que fueron analizadas por Espectroscopia de Infrarrojo, técnica que identifica la presencia de las bandas de tensión, vibración de los grupos funcionales característicos del QS (grupos hidroxilo OH, C-H, CH_2 , CH_3 - NH_2 ,-NH-, C-O-C,) en un rango de frecuencia entre 450 y 4000 cm^{-1} (Escobar *et al.*, 2013). Se utilizó un espectrofotómetro FTIR Modelo Spectrometer Marca Perkin Elmer Serie 74070.

Grado de desacetilación (DD) por valoración potenciométrica.

La determinación del grado de desacetilación (DD) se obtuvo empleando la técnica de valoración potenciométrica, que consistió en disolver el QS en una solución diluida de HCl para favorecer la protonación del grupo amino libre y luego se realizó la valoración con una solución de NaOH hasta que el pH de la solución se estabilice. Se emplearon 0.5 g de QS disueltos en 20 ml de HCl 0.3 M. Esta solución fue titulada con NaOH 0.1 M. Las mediciones de pH se realizaron gradualmente tras la adición de cada mililitro de NaOH en un potenciómetro marca Orión (México), la valoración finalizó cuando el pH tuvo un valor de

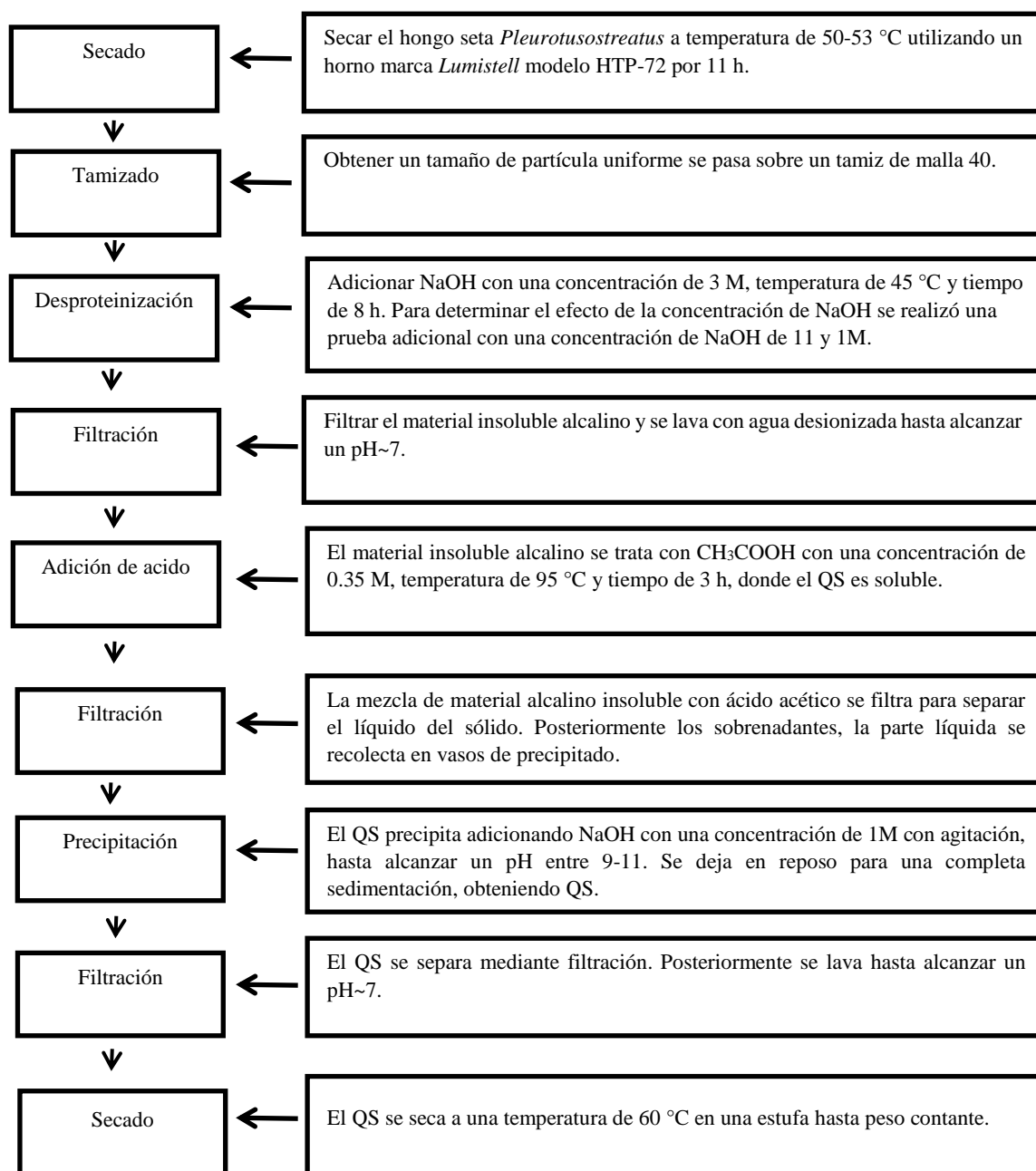


Figura 2.1. Diagrama de bloques para la obtención de QS de *Pleurotus ostreatus* (New *et al.*, 2010).

12, lo cual permitió obtener una curva de titulación del QS, con dos puntos de inflexión, cuyos valores se obtuvieron según el criterio de la primera derivada (dpH/dV). La diferencia entre estos puntos proporcionó la razón de la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del QS. De esta manera se obtuvo el DD mediante la ecuación 2.1.

$$\%DD = 100 - 16.1 \left(\frac{V_2 - V_1}{w} \right) M \quad \text{ec. 2.1}$$

En la ecuación 2.1 V_2 es el punto de inflexión mayor, V_1 corresponde al punto de inflexión menor, expresados como volúmenes de NaOH; M es la molaridad de la solución de NaOH (mol/L); w es el peso del QS empleado (g) y 16.1 es un valor relacionado al peso del grupo amino ($-\text{NH}_2$) (Balanta *et al.*, 2010).

Espectroscopia Infrarroja (IR).

Como banda característica se tomó la absorbancia de 1320 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de estiramiento C-N y como banda de referencia 1420 cm^{-1} a $-\text{CH}_3$ ecuación 2.2 (Brugnerotto, 2001).

$$A_{1320}/A_{1420} = 0.3822 + 0.03133 \times DA \quad r = 0.99042 \quad \text{ec. 2.2}$$

Calorimetría Diferencial de Barrido y Análisis termogravimétrico (DSC/TGA).

El análisis para determinar la temperatura de degradación térmica del QS se llevó a cabo en un TA Instruments DSC Cell (E.U), se colocó una muestra de $2.000 \pm 0.03 \text{ mg}$ en una celda hermética de aluminio, misma que fue colocada en el porta muestras del equipo. Se empleó una rampa de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, hasta llegar a 600°C utilizando una atmósfera de nitrógeno.

Soluciones quitosano y alcohol polivinílico.

Se realizaron dos tipos de preparación de las muestras de QS/PVA:

1.- Se preparó una solución de 100ml al 10% de PVA con agua destilada como solvente y 10 gr de PVA. En la etapa de Solubilización de QS se tomó directamente la solución y se mezcló con la solución de PVA en las siguientes relaciones 25/75, 35/65.

2.- De la solución en fase líquida de QS que se obtuvo en la etapa de solubilización fue tomada para adicionar PVA sólido, se mantuvo en agitación durante 62 h para su incorporación, se prepararon al 10, 8% respectivamente (Cay, Miraftab & Akcakoca, 2016).

Análisis reológico de las soluciones.

La viscosidad de las soluciones es un parámetro relevante, ya que define la posibilidad de formación de las micro y nanofibras, este parámetro fue evaluado mediante un Reómetro de AntonPaar modelo RheolabQCa (EUA) $25 \pm 1^\circ\text{C}$, utilizando la configuración de cilindros concéntricos DG24 y el software StarRheoplus. La viscosidad se determinó como el promedio ponderado del valor obtenido para un rango 50 a 784 (1/s) de la velocidad de corte (Nagihan *et al.*, 2014).

Proceso de electrohilado.

Las soluciones se vertieron en el émbolo de la jeringa del equipo de electrohilado a temperatura ambiente. Para el proceso de electrohilado se emplearon las siguientes condiciones de electrohilado: voltaje total (26 kV), velocidad rotativa del rodillo colector (90 a 100 rpm) y la distancia entre el inyector y el rodillo colector (20 cm) y velocidad de alimentación (0.3 a 0.4 ml/h) (Cay, Miraftab) & Akcakoca, 2016).

Evaluación de las características morfológicas de las microfibras.

La estructura de las microfibras se evaluó usando microscopía electrónica de barrido. El microscopio empleado es un MEB de bajo vacío, modelo JSM-6610LV (E.U), con una diferencia de potencial de 25 KV y una amplificación de 5000X. El análisis se efectuó a 12-15 KV de voltaje de aceleración (Pulido, 2010) (Madene, 2006). El diámetro de las fibras se determinó a partir de 100 mediciones de los diámetros de las imágenes de MEB empleando el software Image J (<https://imagej.nih.gov/ij>) (Cay, Miraftab & Akcakoca, 2016).

Espectroscopia Infrarroja de las microfibras.

Una vez obtenidas las microfibras se realizó la identificación por medio de la presencia de las bandas de tensión, vibración de los grupos funcionales característicos del QS (grupos hidroxilo OH, C-H, CH₂, CH₃ -NH₂, -NH-, C-O-C,) y del PVA (C-H, C-O, C=O) trabajado en un rango de frecuencia entre 450 y 4000 cm⁻¹. Para lo cual se utilizó Espectroscopia de Infrarrojo empleando un espectrofotómetro FTIR Marca PerkinElmer Modelo Spectrmone Serie 74070.

Espectroscopia Raman de las micro y nanofibras.

Se utilizó un sistema Micro-Raman (Xplora Plus microscope from Horiba, Kyoto, Japan) equipado con un microscopio confocal (Olympus BX51, Rochester, NY, EE. UU.), una excitación con láser a 532 nm. Los espectros fueron obtenidos utilizando una rejilla de 1200 gr mm^{-1} con 10 s de tiempo de adquisición, y una acumulación de dos espectros. La potencia del láser fue de 15W mm^{-2} .

Calorimetría Diferencial de Barrido y Análisis termogravimétrico de las micro y nanofibras (DSC/TGA).

Los ensayos de DSC y TGA se realizaron en un calorímetro TA Instruments DSC Cell (E.U). Se tomaron muestras de las microfibras QS ($2\text{ mg} \pm 0.03$) y se sometieron a un intervalo de temperatura de 25 a 600 °C, con una rapidez de calentamiento de 10°C/min y utilizando una atmósfera de nitrógeno, con la finalidad de determinar la temperatura de transición vítrea (T_g), temperatura de cristalización (TC), temperatura de fusión (T_f).

Determinación cualitativa de grupos aminos con ninhidrina.

Esta determinación cualitativa permite identificar la presencia de grupos amino en muestras sólidas, en caso de que estos grupos se encuentren presentes, al contacto con una solución saturada de ninhidrina, se presentará una coloración intensa oscura.

Para la preparación de la solución saturada de ninhidrina se pesaron 1.5 gr de ninhidrina en una balanza y posteriormente se disolvió en un matraz aforado de 25 ml de agua destilada con agitación.

La determinación cualitativa se realizó siguiendo el procedimiento: Se procedió a tomar muestras de 10 mg de microfibras obtenidas que fueron colocadas en cajas Petri para ser añadida la solución saturada, y esperar la aparición de tonalidad oscura en caso de la presencia de grupos amino en las muestras de QS.

Balance de Materia a partir de los datos experimentales.

A partir de las microfibras se obtuvo el flujo másico experimental y posteriormente se realizó un balance de materia.

Capítulo 3

Resultados y discusión

Etapas del proceso de obtención de quitosano.

Uno de los objetivos de esta tesis fue identificar las condiciones para la obtención de QS a partir del hongo *Pleurotus ostreatus*. Las etapas para la extracción de este se reporta según el procedimiento establecido en la sección de Materiales y Métodos.

Como operación inicial fue necesario separar las partes del hongo, en píleo y estipe Figura 3.1, dado que el proceso de extracción del QS fue a partir del sombrerillo de las setas.

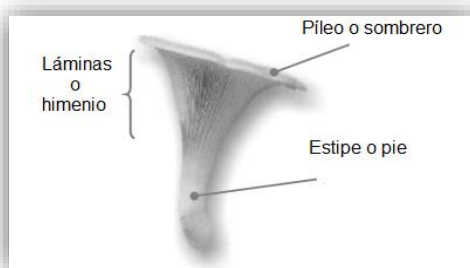


Figura 3.1 Hongo seta con sus partes principales (Gaitán, et al., 2006).

Los hongos fueron adquiridos en su etapa de fructificación no maltratados y de una buena apariencia, cortando de manera manual el estipe, se seleccionaron aquellos hongos cuyos diámetros oscilaban entre 13 ± 2 cm tomando en cuenta que los hongos se encontraran en un buen estado.

Reducción de tamaño o troceado, esta operación se llevó a cabo en el laboratorio, partiendo de muestras con sombrerillo cuyo diámetro oscila de 13 ± 2 cm, procediendo a su troceado y obtención de muestras de 0.5 cm de lado. El objetivo del troceado fue obtener una mayor área y favorecer la remoción de humedad y con ella la extracción del QS.

El secado fue una operación que se realizó inmediatamente después para reducir la descomposición de la muestra, como resultado del proceso de oxidación enzimática característica de esta especie y/o la presencia de tonalidad pardas (Ceballos & Jiménez, 2012). El hongo fue secado para facilitar su manejo, y concentrar los sólidos existentes en la

materia prima incluyendo el QS. El contenido de humedad inicial de la materia prima experimental reportado fue de 93.05 % valor similar al reportado por otros autores en su trabajo en la variedad *Pleurotus* (Ciappini *et al.*, 2004). Durante el secado hubo remoción del agua contenida en la muestra y con ello se incrementó el contenido de sólidos entre ellos: proteínas, carbohidratos, grasas y minerales, permitiendo de esta manera una mayor extracción de QS.

El tiempo de secado se determinó experimentalmente y correspondió a un periodo de 11 horas, hasta que la materia prima presentó un peso constante y un contenido de humedad final promedio de 16.23%. En la Figura 3.2 se presenta la cinética de secado reportando la pérdida de humedad vs. Tiempo (a) y la curva de velocidad de secado expresado en el gráfico velocidad de secado vs. Contenido de humedad b.s (b).

Se observa que durante la cinética de secado, el contenido de humedad se reduce a medida que el tiempo de secado incrementa, comportamiento que fue evidente en la Figura 3.2 (a), y respecto a la curva de la velocidad de secado del material se pueden observar algunas características, entre ellas que no existió un periodo de velocidad constante, sino más bien un periodo de velocidad de secado decreciente, debido a la evaporación de agua ligada de la materia prima y al espesor del material (Salas, *et al.*, 2003).

El periodo de velocidad de secado decreciente puede involucrar una evaporación menor de agua que la velocidad de secado constante pero una mayor fracción de tiempo total de secado. Uno de los modelos más sencillos para describir este periodo establece una relación lineal de la velocidad de secado con la humedad ecuación 3.1

$$dW/dt = aW \quad \text{ec 3.1}$$

Donde W es el contenido de humedad (b.s.) y dW/dt es la pérdida de humedad durante el secado.

Esta expresión establece que la velocidad de secado de los cubos del hongo está en función del contenido de humedad de la materia prima.

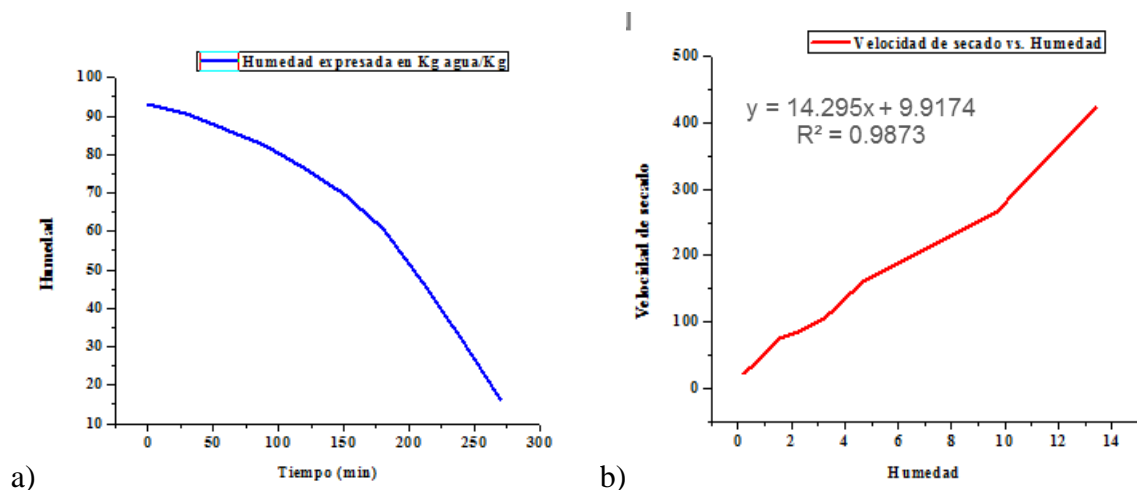


Figura 3.2 Velocidad de secado.

En la Figura 3.3 se muestra el procedimiento de cada una de las operaciones pretratamiento a la que fue sometida la muestra.

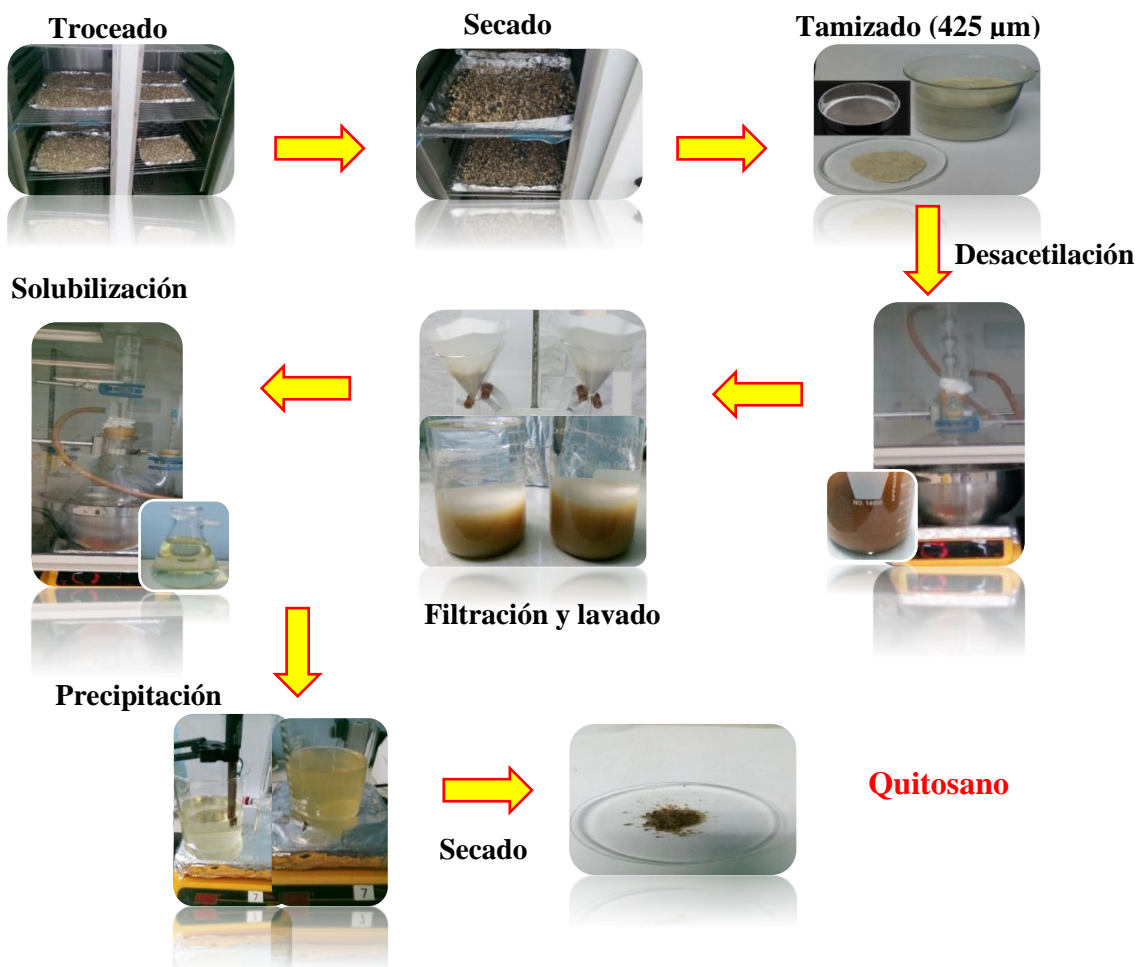


Figura 3.3 Diagrama esquemático del proceso de extracción de QS.

Una vez seco el hongo se molió en una licuadora convencional con la finalidad de disminuir el tamaño, de tal manera que se formara un polvo, que posteriormente se hizo pasar por un tamiz de malla 40 para tener un tamaño de partícula uniforme (425 μ m).

El rendimiento de este proceso fue del 100%, ya que para asegurar este rendimiento las muestras con mayor tamaño fueron sometidas nuevamente al proceso de molienda, permitiendo que no existiera pérdida en el proceso.

Es importante mencionar que este alto porcentaje asegura una baja pérdida económica en caso de que el proceso de extracción se lleve a una escala industrial.

Proceso de desacetilación.

Para llevar a cabo el proceso de desacetilación de la quitina se pesaron 200 g del hongo tamizado, para ser transferido en un matraz de bola de 5 L provisto con una barra magnética para su agitación. Posteriormente se adicionó una solución NaOH con una concentración de 3 M en una relación de 5 ml de solución por cada gramo de hongo. La reacción se mantuvo por 8 h a temperatura de 45 °C y agitación de 100 rpm de manera continua.

Al término de la reacción con las condiciones mencionadas se obtuvo una sustancia líquida de color café oscuro, la parte líquida correspondiente a la proteína, y las partículas sólidas a la QN desacetilada, con un pH de 14.

Para disminuir el exceso de NaOH y alcanzar un pH cercano a la neutralidad, se realizaron una serie de lavados a la pasta resultante, la cantidad de agua desionizada requerida fue de aproximadamente (46 L). Hasta que se alcanzó un pH de 7.8, la coloración de la pasta era crema.

Una vez neutralizada la pasta se llevó a cabo la solubilización del QS. Se pesaron 100 g de pasta que fue transferida a un matraz de bola de 5 L provisto de una barra magnética para agitación. La pasta se mezcló con una solución de CH₃COOH 0.35 M en una relación 5 ml de solución por cada gramo de pasta. Posteriormente fue sometido a agitación a 50 rpm durante 3 h a 95°C. Dicha mezcla se dejó en reposo durante un tiempo aproximado de 17 horas. Al término de este reposo se midió el pH de la mezcla de 2.55.

Para recuperar la parte líquida se procedió a filtrar la mezcla resultante y los sobrenadantes (parte líquida) de cada frasco se reunieron en vasos de precipitados de 1 L.

La precipitación del QS se realizó empleando 49 mL de una solución de NaOH 1 M, para precipitar 500 mL de QS en solución (sobrenadante), esperando para su precipitación un periodo de 58 h, observándose un precipitado de color claro del QS.

El precipitado fue recuperado empleando una centrífuga a 3000rpm por 15 minutos.

El sólido separado se lavó con agua desionizada hasta que alcanzo un pH de 7.8. Finalmente el QS se secó en una estufa a temperatura de 60 °C durante 6 h. (Ver Figura 3.3).

Con base a la literatura (New *et al.*, 2010) el mayor rendimiento de QS obtenido por el método químico es empleando una concentración 11M de NaOH (1.74 g/ 100 g de micelio), sin embargo esta concentración es altamente corrosiva, difícil de manejar y ocasiona daños ambientales en cuanto a residuos. Otra metodología propuesta es utilizar una concentración de 1 M de NaOH, como se reporte en la Tabla 1.1, bajo estas condiciones su rendimiento es bajo (44-107 mg/g) Por tal razón se realizaron pruebas adicionales para ser eficiente el proceso de desacetilación, probándose la concentración de 1M, 3M y 11M, con el objetivo de comparar el rendimiento durante la extracción del QS, siguiendo el mismo procedimiento previamente descrito.

La primera etapa del proceso de extracción es la liberación de proteínas, azúcares; la QN y cadenas β -glucano se acumulan individualmente en la pared celular de los hongos y forman el enlace del interpolímero. La formación de la quitina/quitosano-glucano construye cadenas complejas que resultan en una red reticulada rígida en la pared celular causando un problema considerable para la extracción de QS y glucano por separado. Esta red no se rompe con facilidad en condiciones de extracción suave.

Para la extracción de QS de la pared celular, primero la pared celular es aislada a partir de la biomasa fúngica a través de un tratamiento alcalino con solución diluida de NaOH a temperatura elevada (90-120 °C), presentes en la pared celular (Mohamed *et al.*, 2015), para ello se utiliza un medio fuertemente alcalino que ocasiona la solubilización de la membrana por saponificación de los lípidos presentes en ella. Una vez liberados, los azúcares y proteínas sufren degradación y desnaturalización respectivamente por causa de la temperatura y la concentración empleada de NaOH.

Se describe en seguida el Mecanismo de obtención del QS a partir de hongo (Libardo, 2011). De la QN extraída se obtiene QS mediante la hidrólisis del grupo acetilo, por tratamiento con hidróxido de sodio Figura 3.4.

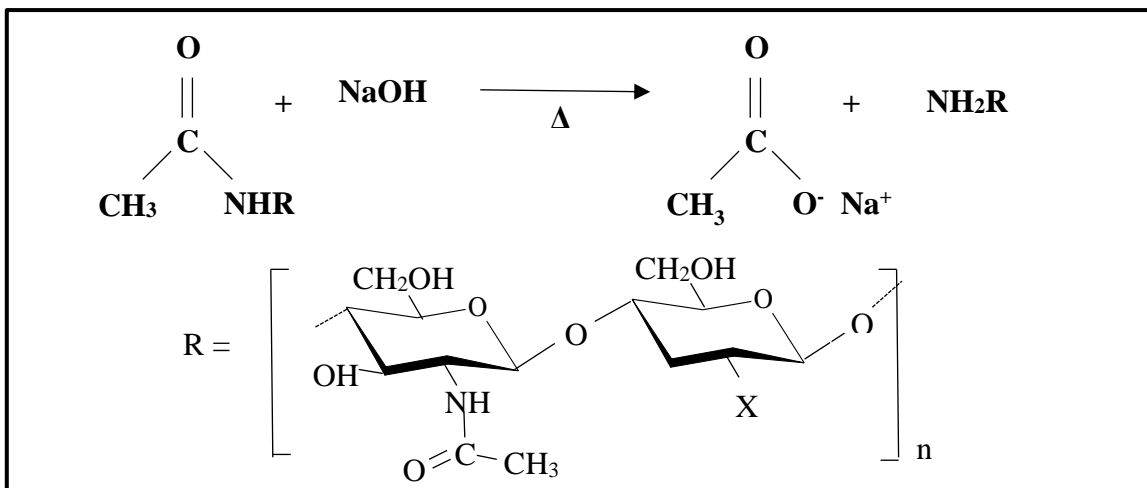


Figura 3.4. Desacetilación de la quitina.

El mecanismo de esta reacción de desacetilación transcurre en tres etapas; la primera etapa consiste en un ataque nucleofílico en la posición electrófila del grupo carbonilo de la QN por parte del grupo hidroxilo y formación del intermediario tetraédrico Figura 3.5.

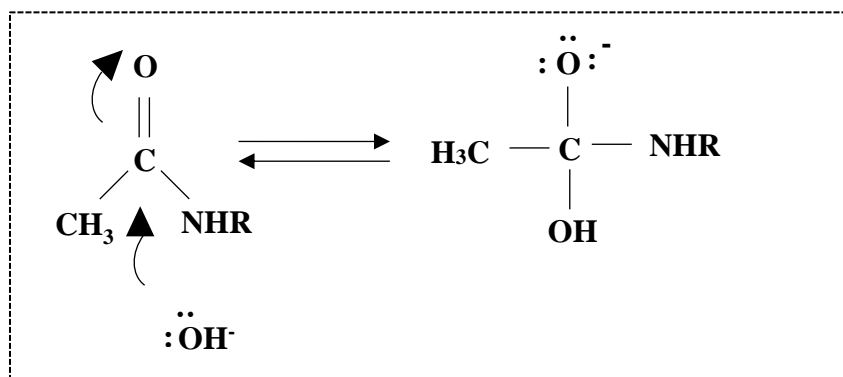


Figura 3.5. Adición nucleofílica del grupo hidroxilo.

En la segunda etapa del mecanismo, el intermediario tetraédrico sufre la eliminación del grupo amino (NHR), para la formación del ácido carboxílico correspondiente Figura 3.6.

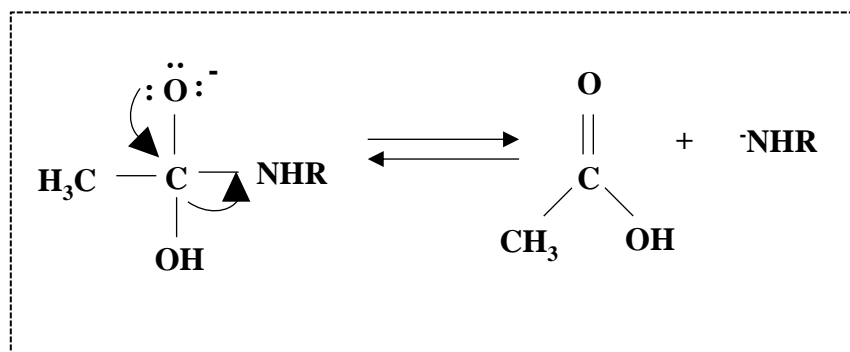


Figura 3.6. Eliminación del grupo amino.

La tercera etapa, la amina (glucosamina) actúa como base desprotonando el ácido. Este equilibrio es muy favorable y desplaza los anteriores equilibrios hacia el producto final Figura 3.7.

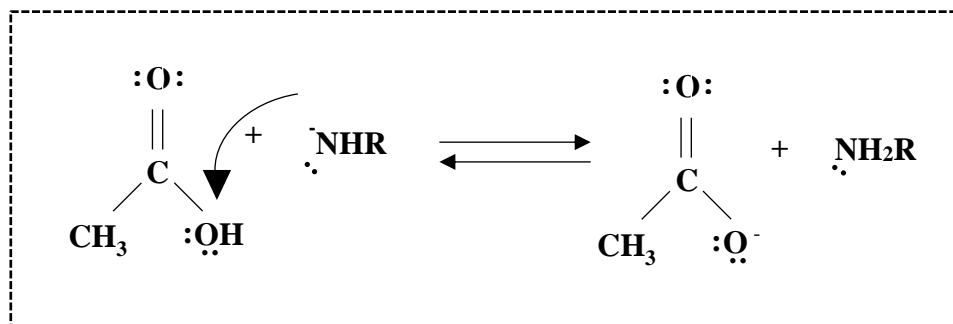


Figura 3.7. Equilibrio ácido – base entre el ácido carboxílico y la amina.

Desacetilación de la Quitina.

Al tratar a la QN con un álcali fuerte se obtiene QS, ya que al ser liberados los grupos acetato se deja libres a los grupos amino del QS.

Solubilización y precipitación de Quitosano.

Una vez terminada la reacción de desacetilación, el QS se encuentra mezclado con algunos residuos de proteínas que no fueron eliminados por completo en medio alcalino, por tal razón estas pastas se adicionan en un medio ácido donde el QS es soluble y el grupo amino libre perteneciente al polímero se encuentra protonado, a esta solución se le adiciona NaOH 1 M para que ocurra la precipitación del biopolímero y de esta manera sea posible separarlo mediante procesos físicos (filtración o centrifugación) de los residuos insolubles.

En la Tabla 3.1 se muestran los rendimientos de QS obtenido con las tres diferentes concentraciones de solución de NaOH 11, 3 y 1 M.

Tabla 3.1 Rendimientos de QS.

Concentración de NaOH	Peso de hongo seco (g)	Quitosano (g)	Rendimiento
11 M	40	0.3451	0.8627 % ± 0.06
3 M	43	0.1789	0.4160 % ± 0.04
1 M	30	0.1040	0.3466% ± 0.04

De los resultados reportados en la Tabla 3.1 se descartó el uso de la solución 1M, dado el bajo rendimiento obtenido. El QS obtenido con las condiciones de solución de NaOH 3M y 11M fue caracterizado mediante FTIR, DSC y TGA.

Identificación del polímero mediante Espectroscopia Infrarroja.

Dado que cada molécula o grupo funcional tiene una absorción característica, a una longitud de onda determinada, a partir del espectro de la molécula del QS se identifican los grupos funcionales característicos del QS obtenido a partir de una solución de NaOH con concentración de 3 M y 11 M en etapa de desacetilación y a su vez compararlo con el QS comercial, Figura 3.8. En el espectro de infrarrojo el QS 3M muestra dos picos de poca frecuencia en 3335 cm^{-1} que es atribuida al grupo hidroxilo -OH y la segunda al grupo NH_2 en 3257 cm^{-1} se observa también otra banda en 2918 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de los enlaces C-H (Knidri *et al.*, 2016), el grupo amida primario aparece en 1639 cm^{-1} (Alzate *et al.*, 2015), banda del grupo $-\text{CH}_3-$ a 1414 cm^{-1} y vibraciones de estiramientos de la amida III C-N a 1315 cm^{-1} (Dong *et al.*, 2001).

Para la muestra de QS extraída con solución de 3M, se presenta una señal intensa en la longitud de onda de 1019, correspondiente al estiramiento C-O.

Para el caso del QS 11 M se observa una banda con dos picos de poca frecuencia en 3354 cm^{-1} que es atribuida al grupo hidroxilo -OH y la segunda al grupo $-\text{NH}_2$ en 3290 cm^{-1} en el espectro también se observa otra banda en 2876 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de los enlaces carbono-hidrogeno (C-H), el grupo amida primario aparece en 1645 cm^{-1} , deformación del enlace N-H en 1585 cm^{-1} , banda del grupo $-\text{CH}_3-$ a 1419 cm^{-1} y vibraciones de estiramientos C-N a 1317 cm^{-1} .

En la Figura 3.8 se presenta el espectro IR, así como la estructura de la QN y el QS, en el cual se observa la diferencia en su estructura.

El análisis del espectro muestra que el QS extraído con solución 3M contiene aun moléculas de QN, mientras que la muestra de QS extraído con solución 11M presenta una mayor pureza dada la similitud con la señal emitida por la muestra de QS comercial puro.

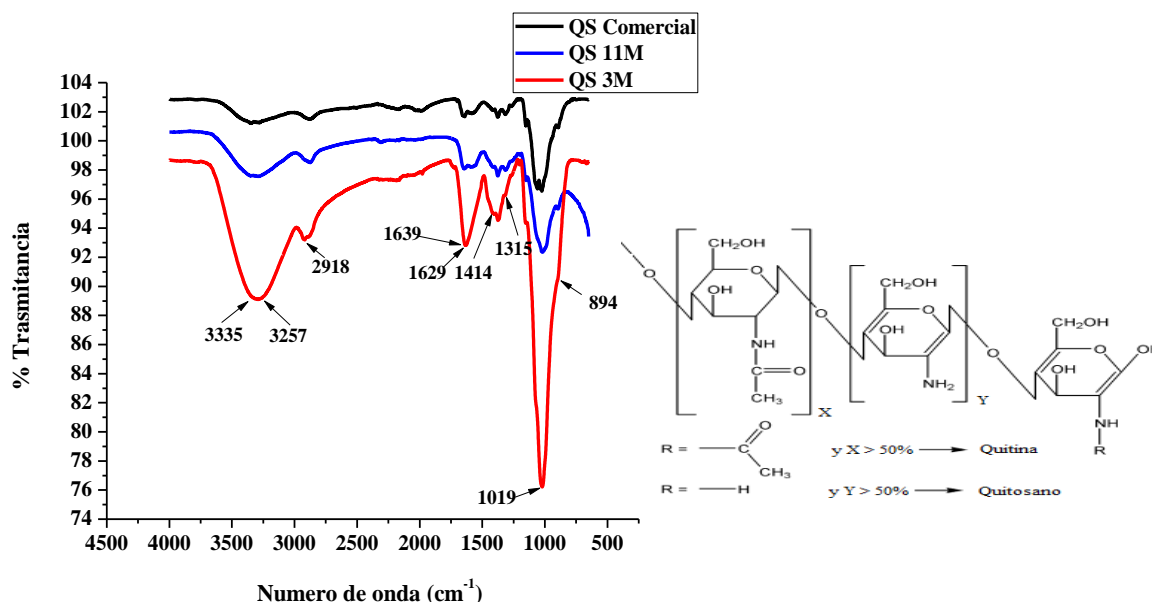


Figura 3.8. Espectro de IR de QS Comercial 3M y 11 M.

Caracterización del QS.

Para determinar el grado de desacetilación DD se realizaron dos métodos: valoración potenciométrica y espectroscopia infrarroja.

Grado de desacetilación por valoración potenciométrica.

Para realizar la valoración potenciométrica del QS 3 M se emplearon 0.08 g de QS disueltos en 3.5 mL de HCl 0.3 M. Esta solución se tituló con NaOH 0.1 M. Las mediciones de pH se realizaron gradualmente conforme se adicionaba cada mililitro de NaOH en un potenciómetro marca Orion, la valoración concluye cuando el pH llega a 12 (Balanta *et al.*, 2010).

La Figura 3.9 muestra resultados de valoración potenciométrica para la muestra de QS extraído de *Pleurotus ostreatus*, donde se genera la curva de titulación con dos puntos de inflexión el primer punto corresponde al HCl en exceso y el segundo al QS protonado, la diferencia entre los dos puntos de inflexión a lo largo del eje de abscisas corresponde a la cantidad de ácido requerida para protonar los grupos amino de QS cuyos valores se determinaron según el criterio de la primera derivada; dichos puntos corresponden a los máximos. Los resultados de DD por esta técnica se muestran en la Tabla 3.2

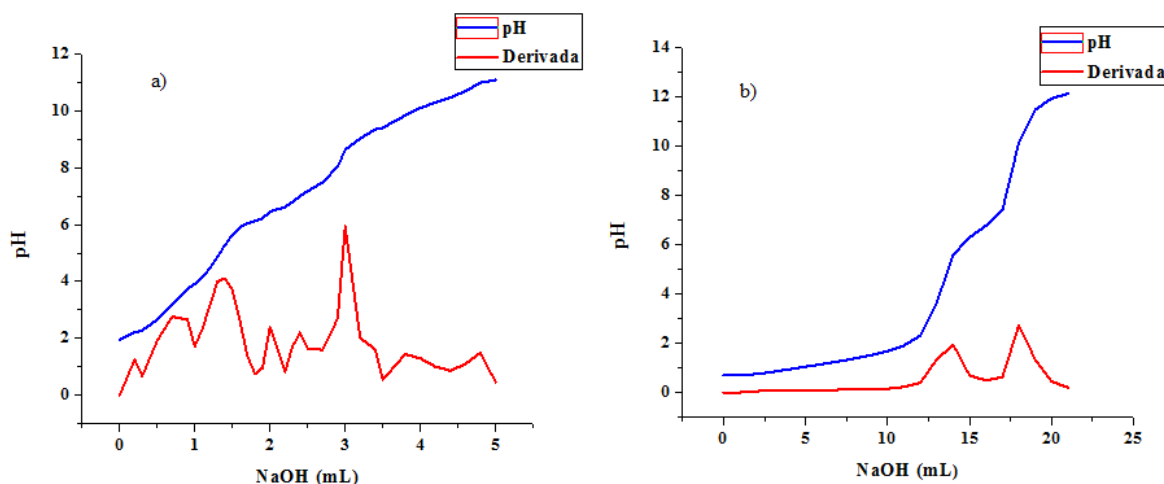


Figura 3.9. Curva de titulación quitosano a) 3 M b) 11M.

Se observó que el grado de desacetilación es mayor al usar la concentración 3M en unidades porcentuales.

Tabla 3.2. Valoración potenciométrica del QS 3 M y 11 M.

Concentración	NaOH (M)	V ₂ -V ₁	%DD
3 M	0.1	1.5	61.36 ± 4.00
11 M	0.1	4	57.06 ± 5.30

Grado de desacetilación por Espectroscopia Infrarroja.

Para determinar el grado de desacetilación por Espectroscopía Infrarroja se retoma el trabajo de Brugnerotto (2001) ya que abarca un rango de valores de DA que va de 0.5-97.9 así como una amplia variedad de fuentes de materiales para la obtención de QS (camarones, cangrejos, langosta) y utiliza resonancia magnética nuclear (RMN) como técnica absoluta para determinar los DA de muestras de QN y QS, Para la identificación de una banda característica y una de referencia propone comparar los espectros IR de las dos moléculas que representan las unidades de repetición de la QN (N-acetilglucosamina) y el QS (glucosamina). Al comparar ambos espectros, se podría apreciar que una banda característica aparece en 1320 cm⁻¹ para N-acetilglucosamina, como banda de referencia propone evaluar dos posibles bandas a 3450 cm⁻¹ y 1420 cm⁻¹. Al elaborar las curvas de calibración, trazando las relaciones de adsorción (banda característica/banda de referencia) de muestras de QN y QS, frente a su

DA obtuvo las siguientes correlaciones entre los valores experimentales de DA y las relaciones de absorbancia A_{1320}/A_{3450} y A_{1320}/A_{1420} , expresadas por la ecuación 3.2 y 3.3.

$$A_{1320}/A_{3450} = 0.03146 + 0.00226 \times DA \quad r = 0.97036 \quad ec. 3.2$$

$$A_{1320}/A_{1420} = 0.3822 + 0.03133 \times DA \quad r = 0.99042 \quad ec. 3.3$$

Un coeficiente de correlación, r , proporciona una manera cuantitativa para expresar el grado de asociación existente entre las dos variables. El propósito para determinar el coeficiente de correlación es evaluar la fiabilidad de los instrumentos IR que miden la absorción de bandas características y de referencia. Un alto coeficiente de correlación significa gran fiabilidad y bajo coeficiente de correlación baja confiabilidad.

Una vez que se identificó el polímero de 3 y 11 M del hongo seta (*Pleurotus ostreatus*) se calculó el DA del QS mediante la correlación de Brugnerotto, ecuación 3.3 evaluando la absorción de las bandas características de la amida III localizada a 1315 cm^{-1} para QS 3 M y 1317 cm^{-1} para 11 M, y como referencia las bandas de los grupos metilos a 1414 cm^{-1} y 1418 cm^{-1} respectivamente. Mientras que para conocer el DD se utilizó la ecuación 3.4.

$$\text{Grado de desacetilacion} = 100 - DA \quad ec. 3.4$$

Sustituyendo los valores de absorción correspondiente se obtiene los DA reportados en Tabla 3.3.

Tabla 3.3. DD del QS por IR. 3M y 11 M.

Concentración	DA	%DD
3 M	18.2651	81.7348±0.26
11 M	23.4762	76.5237±0.46

Como se muestra en la Tabla 3.2 y 3.3, el porcentaje de DD es mayor para las muestras de QS obtenida con solución de NaOH 3M, los resultados son diferentes, pero presenta la misma tendencia. El grado de DD que mayor certidumbre proporciona es el de IR, dado que la determinación del DD por titulación puede presentar un cierto margen de error debido a la cantidad de lecturas, la adherencia del QS al electrodo del potenciómetro en el momento de

hacer la valoración; ocasionando imprecisión en las lecturas. Algunos autores mencionan que con un porcentaje mayor a 50% de DD se considera que es QS, Rinaudo (2006).

Desde el punto de vista de aplicación comercial se puede decir que se puede hacer con el QS 3M aplicado a la industria médica regenerativa aunque es bajo su rendimiento (0.4160%). sin embargo el uso de solución de NaOH al 11M, presenta un DD menor, que limita su uso tal y como se muestra en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Recomendaciones generales para la aplicación del QS (Aranaz *et al.*, 2009).

Aplicaciones	Recomendaciones Generales
Cicatrización de heridas	<ul style="list-style-type: none"> • QS con alto DD. • Muestras de bajo peso molecular (Mw) (oligómeros).
Sistemas de administración de medicamentos	<ul style="list-style-type: none"> • Alto DD. • Alto Mw.
Entrega de genes	<ul style="list-style-type: none"> • $DD \leq 80$ • Bajo Mw (alrededor de 10 KDa)
Andamios (ingeniería de tejidos)	<ul style="list-style-type: none"> • DD alrededor de 85 (buena proliferación y estructura). • Alto Mw (biodegradación prolongada).
Inmovilización celular	<ul style="list-style-type: none"> • QS con alto DD.
Inmovilización de enzimas	<ul style="list-style-type: none"> • Dependerá de la enzima, el método de inmovilización y medios de reacción • Bajo contenido en cenizas • Alto DD para la adsorción, covalente y encapsulación.
Conservación de alimentos	<ul style="list-style-type: none"> • Alto DD. • Medio-bajo Mw (5-80 kDa).
Agente emulsionante	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo DD para estabilidad de emulsión • Alta viscosidad
Tratamiento de aguas residuales	<ul style="list-style-type: none"> • Dependerá de las condiciones de los contaminantes y agua (pH, fuerza iónica). • En general, se utiliza QS con alto DD. • Baja cristalinidad

Calorimetría Diferencial de Barrido QS.

Es una técnica que permite medir el flujo de calor con respecto a la temperatura aplicada a la muestra que se encuentra en una atmósfera de N₂, lo que permitió encontrar diferencias en el

comportamiento termodinámico del QS. Los resultados del análisis calorimétrico de las concentraciones de 3 M y 11 M en la etapa de desacetilación se muestran en la Figura 3.10.

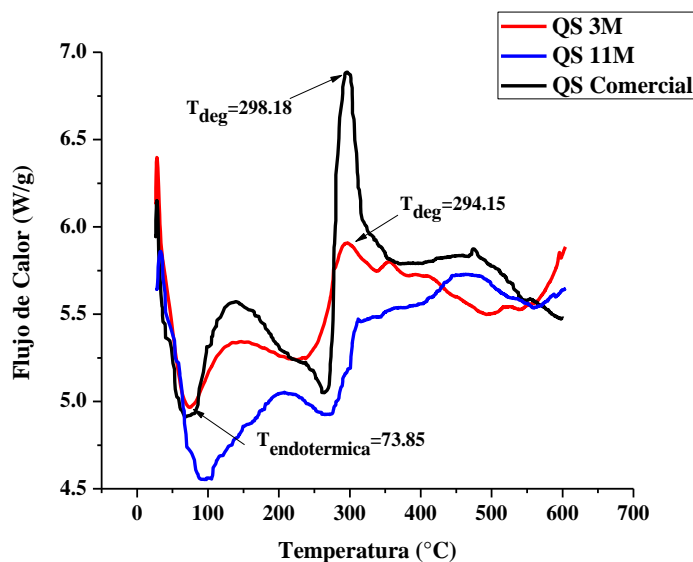


Figura 3.10. Termograma de QS comercial, 3 M y 11M.

Los polisacáridos generalmente tienen una gran afinidad por el agua, y en el estado sólido estas macromoléculas pueden tener estructuras desordenadas que pueden hidratarse fácilmente (Kittur *et al.*, 2002). Tal y como se muestra en la Figura 3.10 el primer barrido se observa un pico endotérmico ancho a 73.85°C para el QS 3M, debido a la evaporación del agua presente en la muestra (Suyatma *et al.*, 2011). La temperatura de transición vítrea (T_g) es afectada por las condiciones de procesamiento y está relacionada con la concentración de cadenas amorfas en la muestra que es afectada por factores como la movilidad molecular (Solange). Lo más importante a destacar es que ni el QS comercial y el QS extraído presentan el fenómeno de la transición vítrea ya que éste absorbe humedad y posee una cadena polimérica muy rígida constituida de unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa por lo que el cambio en la capacidad calorífica correspondiente a la variación de volumen específico en la T_g es muy pequeño y difícil de observar (Merino *et al.*, 2016). Sin embargo, los valores reportados en literatura, 202 °C (Suyatma *et al.*, 2011) y 194 °C (Suyatma *et al.*, 2004) son muy superiores al de la T_g del ácido poliláctico (PLA). En la región comprendida entre 250-450°C está dominada por eventos térmicos relacionados con procesos de degradación de estos polímeros. Nuestra temperatura de degradación a 294.15 °C es menor comparada con la del QS comercial. Debido a que la quitina se transforma en QS, se hace menos estable

térmicamente, exhibiendo una máxima velocidad de descomposición a menores temperaturas, probablemente debido al predominio de la forma no acetilada y a la menor cristalinidad mostrada por el QS (Escobar *et al.*, 2013). Trabajos previos han demostrado que cuando hay diferencias marcadas en el peso molecular, y por lo tanto en el grado de polimerización de las muestras de QS se observa un desplazamiento en la posición del pico de degradación exotérmico de hasta 10°C (Kittur *et al.*, 2002).

Análisis Temogravimétrico QS.

En la Figura 3.11 se muestran las curvas de pérdida de masa (TGA) para el QS comercial y experimental.

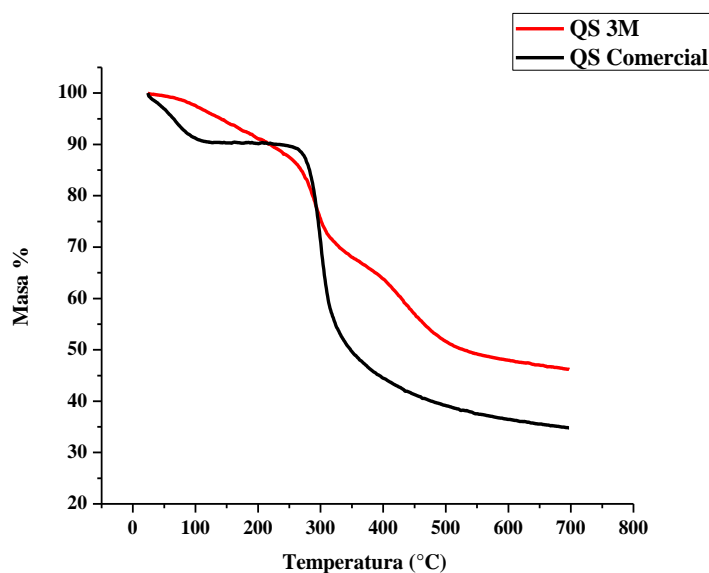


Figura 3.11. TGA quitosano 3M y comercial.

En el QS comercial, en la primera etapa del proceso de degradación que va de 24 a 261°C hay una pérdida de masa de aproximadamente 11%, lo cual se debe a la evaporación de agua (Alzate, 2015). La segunda etapa y más predominante ocurre a 298.15°C, en la que se observa una pérdida de masa de aproximadamente 32% en esta etapa se llevan a cabo reacciones de despolimerización / descomposición de las cadenas de polímero a través de la desacetilación y escisión de los enlaces glucosídicos (Moussout *et al.*, 2016). La última etapa, para una temperatura superior a 400°C (10% de pérdida de peso), corresponde a la destrucción térmica del anillo de piranosa y la descomposición del carbono residual. En el QS experimental, se aprecia una pérdida de masa aproximada al 31% a 294.15 °C.

Caracterización de las soluciones de PVA y QS.

Para la obtención de fibras de QS extraído del hongo *Pleurotus ostreatus*, se realizaron dos métodos para la preparación de las soluciones. El primero consistió en preparar una solución al 10% de PVA grado técnico (Marca MEYER) que fue mezclado con el QS en solución de ácido acético en las siguientes relaciones QS/PVA; 25/75, 35/65 respectivamente. El otro método consistió en añadir directamente el PVA sólido al QS en solución y dejarlo en agitación durante 62 h, al 10 y 8 (% p/v), para su posterior caracterización reológica. Los parámetros de las soluciones electrohiladas se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Parámetros de las soluciones electrohiladas.

Soluciones	Relación QS/PVA	Viscosidad (cP)	pH	Conductividad (μS)	Tiempo (h)	Voltaje (kV)	Distancia (cm) Ajuja-Colector
L 25/75	25/75	225 \pm 10.19	4.01	504 \pm 2	1	26	20
L 35/65	35/65	254 \pm 11.95	3.98	594 \pm 2	1	26	20
S10% (p/v)	10	197 \pm 9.41	3.61	1163 \pm 1	1	21	20
S8% (p/v)	8	399 \pm 10.01	3.58	1270 \pm 2	1	26	20

Estas soluciones presentaron valores de conductividad eléctrica entre 504 a 1270 μS , la conductividad del PVA al 10% en solución pura es de 795.8 μS , mientras que la conductividad eléctrica del QS en solución de ácido acético es de 1604 μS como resultado de la protonación del grupo amida ($-\text{NH}_2$).

La incorporación de PVA a la solución de QS afecta notablemente las propiedades de las soluciones. Como se muestra en la tabla anterior el pH de las soluciones se redujo, debido a la adición del ácido acético en la solución de QS tal y como lo reporta (Cay *et al.*, 2016).

Con respecto a la viscosidad es un parámetro importante para la formación de las fibras, dado que este factor es la resistencia para el flujo de la muestra en el inyector. Como primer punto se realizó un análisis individual de las muestras de PVA al 10% y una de QS extraído los resultados se muestran en la Figura 3.12.

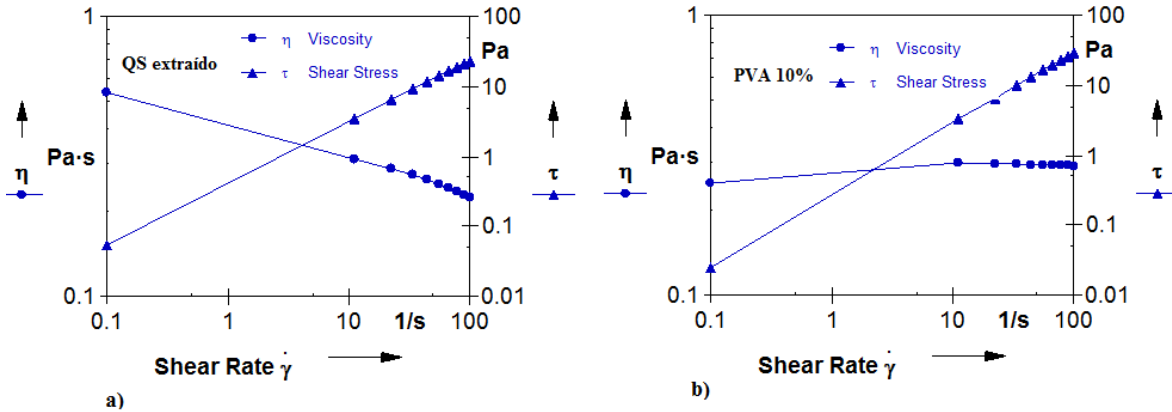


Figura 3.12. Análisis Reológico de a) QS extraído y b) PVA 10%.

Como se puede apreciar en la Figura 3.12 el PVA se comporta como un fluido Newtoniano dado que la relación esfuerzo de corte contra el gradiente de deformación es lineal y su viscosidad es constante. Sin embargo la viscosidad de QS cambia con el tiempo esto debido a que tiene una alta viscosidad requiere mayor esfuerzo de corte para su adelgazamiento y se pueda comportar como un fluido newtoniano a bajas concentraciones. Para poder electrohilar QS es necesario un estabilizador que pueden ser: PVA, policaprolactona, poli (ácido láctico), poli (ácido Lláctico) que le confiere una menor viscosidad, y de esta manera tener un comportamiento newtoniano. Dadas las propiedades biológicas del PVA y las de QS; las nanofibras obtenidas presentan mayor biocompatibilidad, adhesión celular y proliferación (Balagangadharan *et al.*, 2016).

En la Figura 3.13 se puede apreciar un comportamiento newtoniano de las relaciones líquidas al combinar QS extraído con PVA, y en la Figura 3.14 las relaciones sólidas.

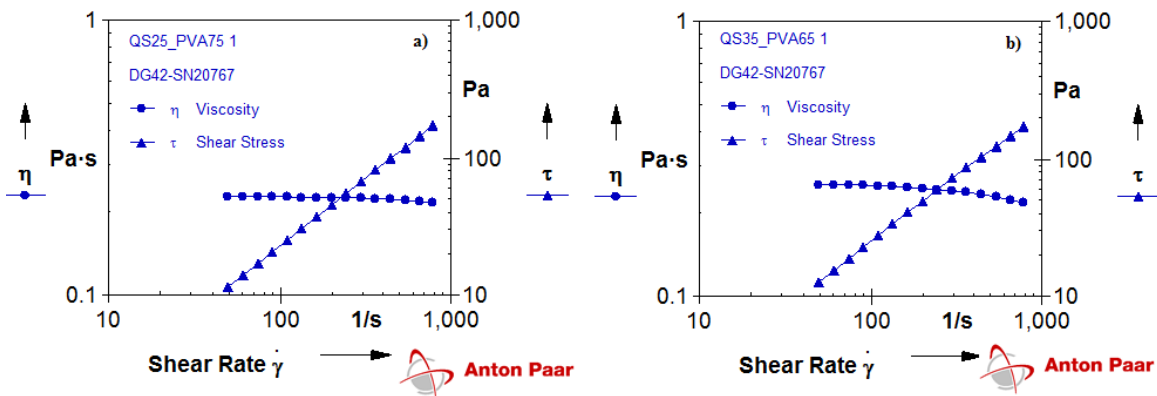


Figura 3.13. Análisis Reológico de soluciones líquidas de QS/PVA a) 25/75 y b) 35/65.

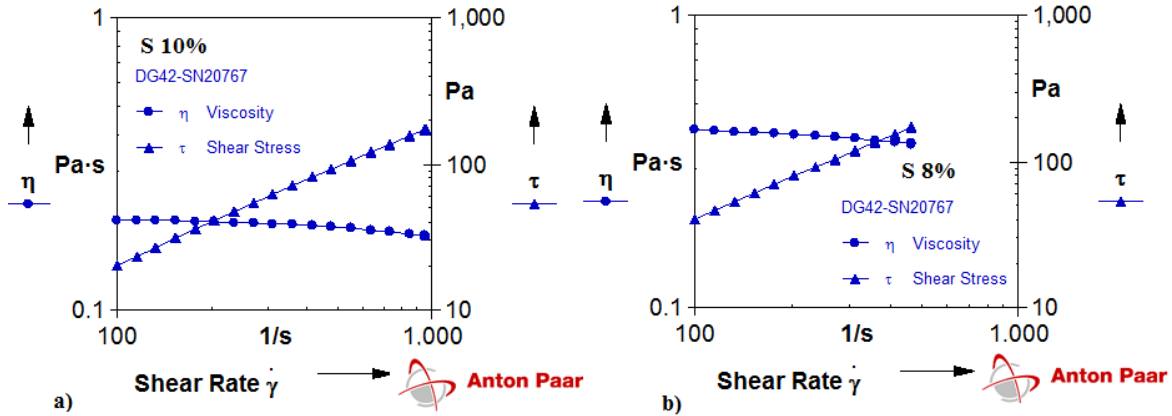


Figura 3.14. Análisis Reológico de soluciones sólidas QS/PVA a) S 10% y b) S 8%.

La viscosidad de las soluciones es otro parámetro importante que determina la morfología de las nanofibras y la formación del cono de Taylor. Se puede observar en la Tabla 3.5 que las viscosidades de las soluciones de QS/PVA se incrementaron con el aumentando en el contenido de QS en las soluciones líquidas y sólidas (Koosha & Mirzadeh, 2015). Cuando se pretendía utilizar una solución de PVA pura al 8% y mezclarla en una relación de 35/65 QS/PVA, la solución resultante era más líquida, y por ende la tensión superficial también lo era, impidiendo la formación de fibras aun aplicando un campo eléctrico de 35 KV. Por ello se utilizó una solución de PVA pura al 10% para dar más estabilidad a las soluciones líquidas resultantes.

Morfología de las microfibras.

La morfología de las microfibras de QS/PVA electrohiladas fue caracterizada mediante microscopía electrónica de barrido (MEB, JSM-6610LV). Los diámetros de las fibras se determinaron utilizando el software Image J, mediante el trazado de líneas perpendiculares a los ejes de las fibras en las imágenes de MEB. Los valores de píxeles de las líneas se convirtieron a valores de diámetro. En cada caso se realizaron 100 mediciones en diferentes partes de las fibras. Las micrografías y los histogramas de distribución de diámetro de las nanofibras resultantes se presentan en la Figura 3.15 y 3.16.

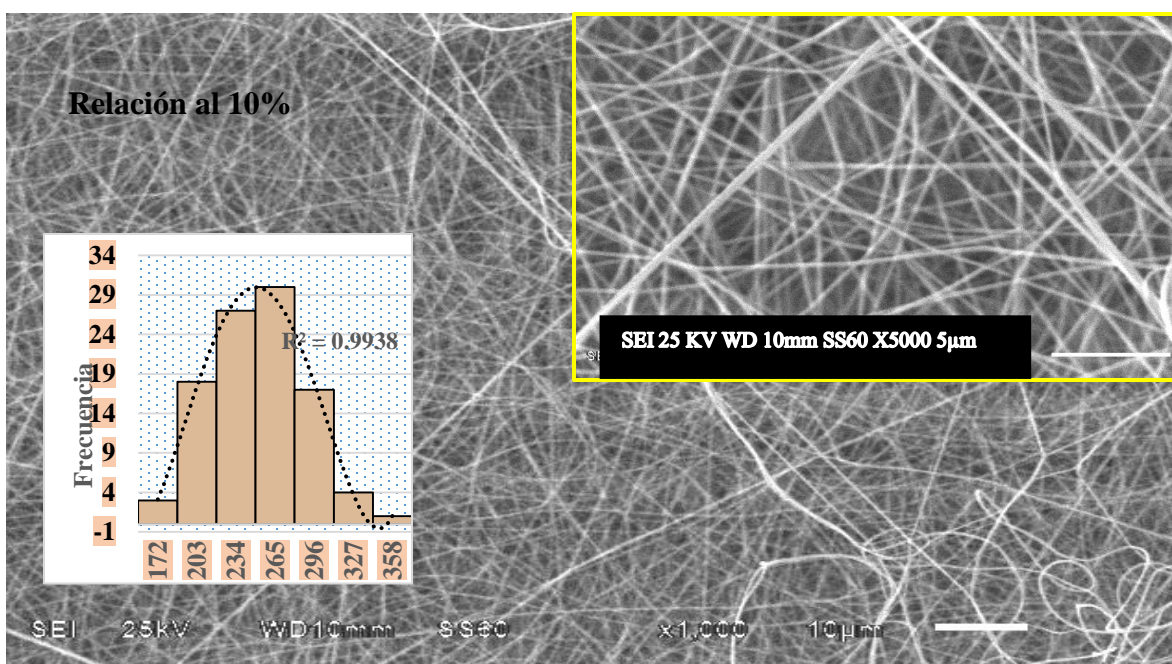
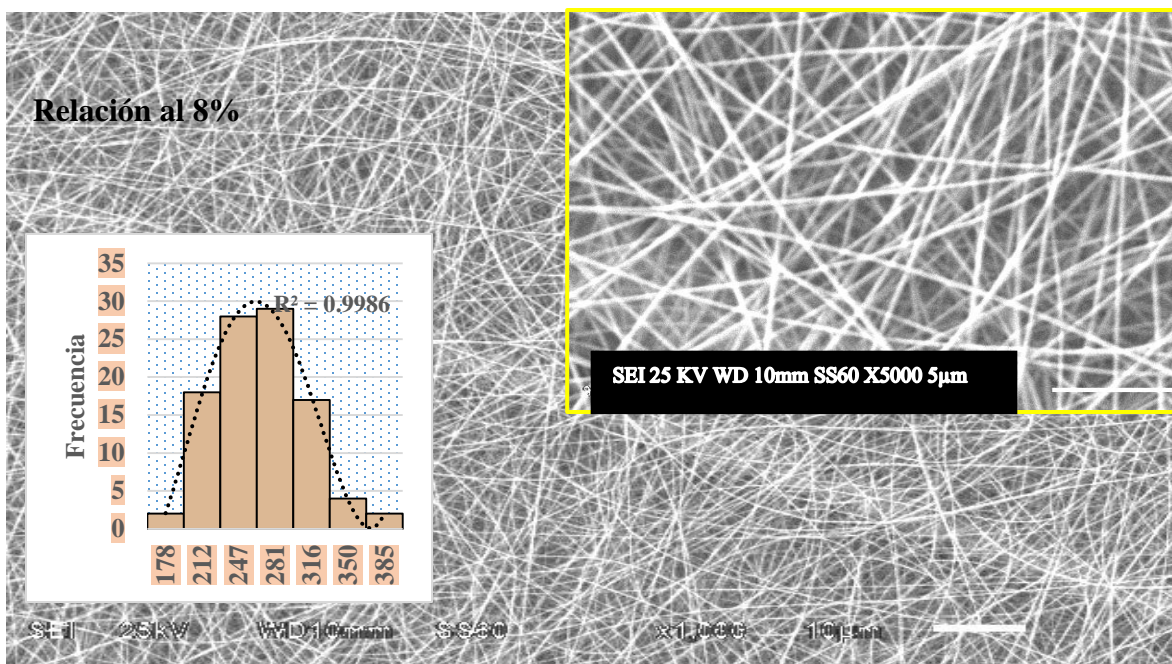


Figura 3.15. Micrografías de QS/PVA sólidas a) 10% y b) 8%.

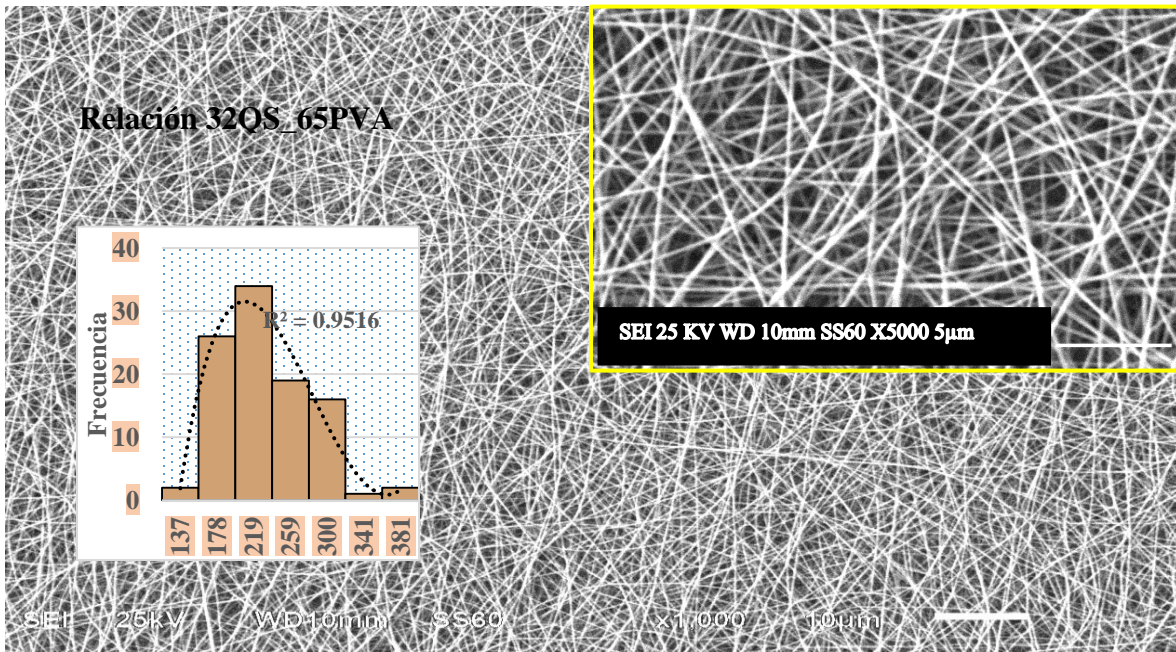
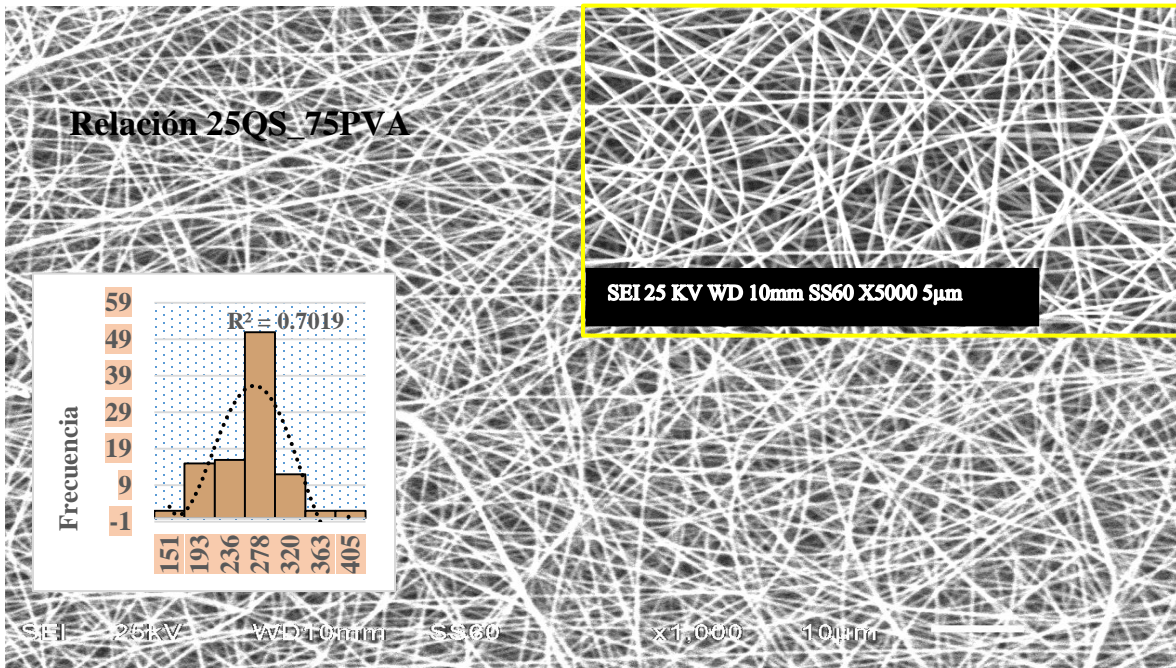


Figura 3.16. Micografías QS/PVA líquidas a) 25/75 y b) 35/65.

Tabla 3.6. Diámetros promedios a partir de las micrografías SEM.

Relación QS/PVA	Diámetro Promedio (nm)	Desviación Estándar
25/75	265.30	47.69
35/65	237.19	53.76
10%	265.65	46.96
8%	249.85	37.31

Esta disminución en el diámetro como se muestra en la Tabla 3.6 está relacionada con la naturaleza policationica del QS, ya que la adición de este polímero incrementa la conductividad y a su vez genera mayor densidad de carga en el flujo, lo cual produce mayor estiramiento en las fibras (Jia *et al.*, 2007).

Balance de materia para contenido de Quitosano final.

La eficiencia de la encapsulación del quitosano extraído del Hongo *Pleurotus ostreatus* en las fibras se determinó mediante un balance de materia a partir de las concentraciones iniciales y la identificación de la pérdida de humedad durante el proceso de electrohilado de la fibra. En la Figura 3.17 se define el sistema a estudiar para determinar el porcentaje final de QS contenido en las microfibras.

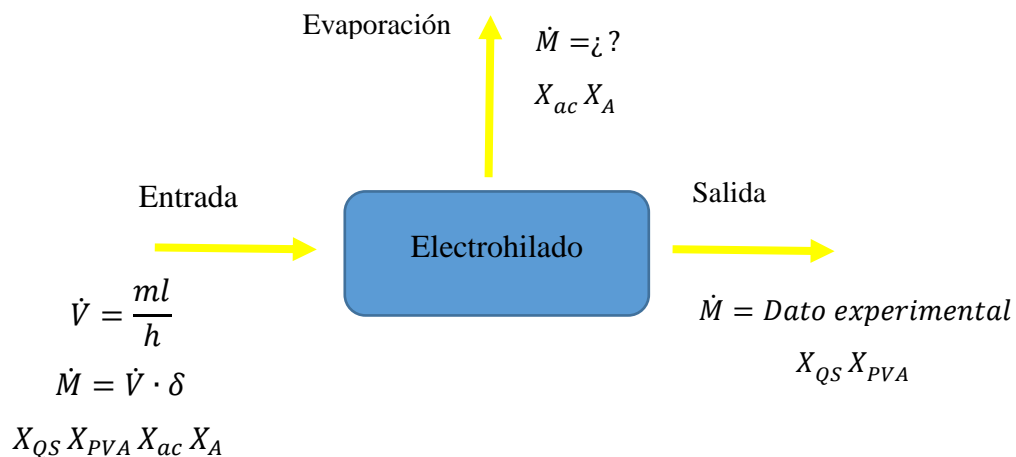


Figura 3.17 Esquema del balance de materia del sistema de estudio.

En las ecuaciones a emplear se consideró flujos y fracciones másicas:

Balance General:

$$\text{Entrada} = \text{Evaporación} + \text{Salida}$$

Balance por componentes:

- Quitosano $X_{QS}^E(\text{Entrada}) = X_{QS}^{Ev}(\text{Evaporación}) + X_{QS}^S(\text{Salida})$
- Ácido Acético $X_{ac}^E(\text{Entrada}) = X_{ac}^{Ev}(\text{Evaporación}) + X_{ac}^S(\text{Salida})$

Donde se considera que X_{QS}^{Ev} y X_{PVA}^{Ev} son iguales a cero.

- Alcohol Polivinílico $X_{PVA}^E(\text{Entrada}) = X_{PVA}^{Ev}(\text{Evaporación}) + X_{PVA}^S(\text{Salida})$
- Agua $X_a^E(\text{Entrada}) = X_a^{Ev}(\text{Evaporación}) + X_a^S(\text{Salida})$

Para determinar el flujo másico experimental a la salida de las microfibras, primero se determinó el área total de superficie electrohilada durante 60 minutos, posteriormente se tomaron 4 muestras con un área de 2 cm² en promedio de forma aleatoria, se pesaron en una micro-balanza analítica marca Thermo Cahn (C-33, EUA) y se obtuvo un promedio de los gramos de microfibra de QS y PVA por cm². Con este valor, se determinó experimentalmente el flujo másico total (g/h) a la salida del sistema. El valor experimental y teórico se reportan en la Tabla 3.7.



Figura 3.18. Determinación del peso de la fibra experimental.

Como se muestra en la Tabla 3.7 se obtuvo un mejor rendimiento en las microfibras con una concentración al 8 %, obteniéndose 0.33 porcentaje peso de QS, para las mezclas líquidas su porcentaje oscilaba entre (0.14-0.09).

Tabla 3.7 Balances de materia experimental y teórico.

	Unidades	Entrada	Evaporación	Salida Teórica	Salida Experimental
Relación QS/PVA	%	8	8	8	8
Flujo másico	mg/h	0.304622	0.278018	0.026603	0.027405
Componentes					
QS		0.000251	---	0.003393	
PVA		0.073988	---	0.996606	
CH₃COOH		0.019403	0.020959	---	
H₂O		0.906356	0.979040	---	
Relación QS/PVA	%	10	10	10	10
Flujo másico	mg/h	0.275016	0.245672	0.029343	
Componentes					
QS		0.000247	---	0.002716	
PVA		0.090805	---	0.997283	
CH₃COOH		0.019051	0.020959	---	
H₂O		0.889895	0.979040	---	
Relación QS/PVA		25/75	25/75	25/75	25/75
Flujo másico	mg/h	0.314014	0.289451	0.0245625	
Componentes					
QS		6.03E-05	---	0.0009071	
PVA		0.066456	---	0.9990928	
CH₃COOH		0.004647	0.004978	---	
H₂O		0.928835	0.995021	---	
Relación QS/PVA		35/65	35/65	35/65	35/65
Flujo másico	mg/h	0.323702	0.3013662	0.0223360	0.021567
Componentes					
QS		8.57E-05	---	0.0014646	
PVA		0.058474	---	0.9985353	
CH₃COOH		0.006605	0.0070167	---	
H₂O		0.9348334	0.9929832	---	

Identificación de Aminoácidos cualitativamente con ninhidrina.

La reacción de la ninhidrina con un grupo amino primario formará un producto de reacción de color, también llamada púrpura de Ruhemann (dicetohidrindilideno-dicetohidrindamina). Esta reacción ha sido conocida y estudiada durante años y se usa ampliamente para el análisis de aminoácidos. Como la reacción de ninhidrina es específica para grupos aminos primarios,

esta reacciona con las unidades 2-amino-2-desoxi- β -D –glucopiranososa (GlcN) dando como resultado un color más intenso, mientras que para las unidades 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranososa no reacciona y su coloración fue menos intensa (Prochazkova *et al.*, 1999).

Entre la ninhidrina y el aminoácido ocurre una reacción de adición nucleofílica, donde se eliminan dos moléculas de agua y ocurre un proceso de deshidratación (Delgado, 2012) como se muestra en la Figura 3.19.

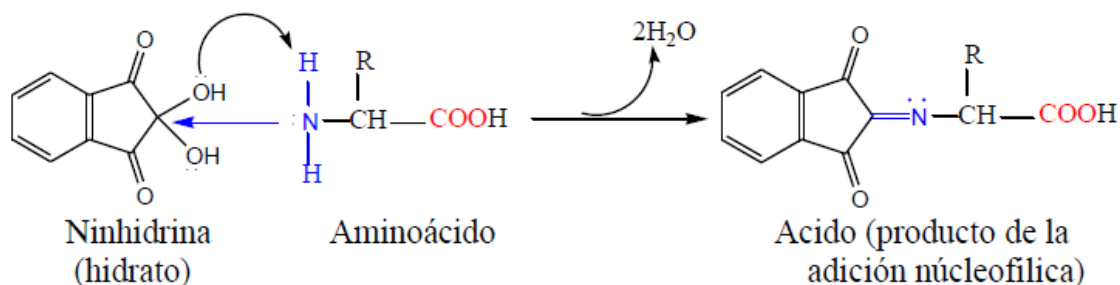


Figura 3.19. Mecanismo de reacción de la ninhidrina y un aminoácido.

Para tener un comparativo entre la intensidad de color se realizó la prueba con ninhidrina con los blancos QS y PVA, como se muestra en la Figura 3.20 no presentó ningún tipo de coloración el PVA en solución.

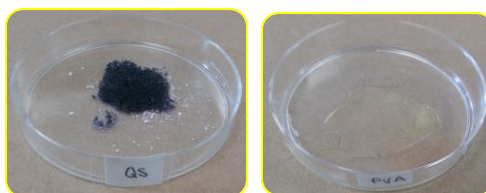


Figura 3.20. Blancos de QS y PVA.

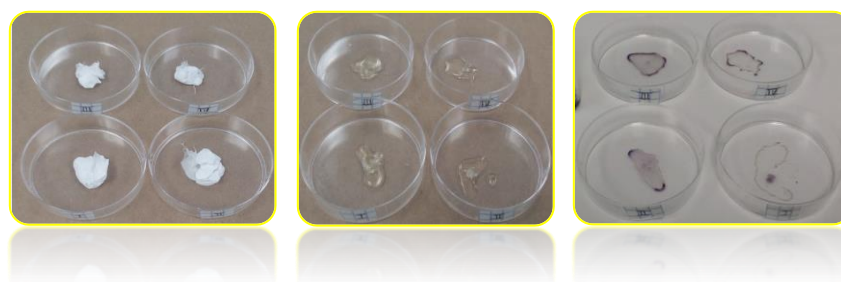


Figura 3.21. Resultados de las soluciones sólidas y líquidas con ninhidrina.

El QS es un polímero lineal formado por monómeros de 2-amino-2-Desoxi-D-glucopiranososa (D-glucosamina GlcN) y en menor medida de 2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranososa (N-acetil glucosamina). La cantidad de color producido por unidad GlcN aumento con la fracción decreciente de unidades acetiladas tal y como se muestra en la Figura 3.21 las muestras que fueron tratadas con el tratamiento 1 muestra I (25/75) y II (35/65) cuanto mayor es la cantidad de grupos amino libres (unidades GlcN), mayor es el color. De misma manera se observó con las muestras que fueron tratadas con el tratamiento 2 muestra III (8%) y muestra IV (10%).

Espectroscopia FTIR microfibras.

En la Figura 3.22 se muestran los FTIR de las microfibras del QS extraído del hongo *Pleurotus ostreatus* con la adición de PVA sólido, se analizaron los picos característicos tanto del QS como el del PVA, se observó un pico ancho e intenso alrededor de 3350 cm^{-1} para las cuatro mezclas correspondiente al grupo -OH , esta banda se desplaza hacia abajo al aumentar el contenido de PVA presente en las muestras (Bonilla *et al.*, 2014), el pico alrededor de 1592 cm^{-1} corresponde a vibración N-H más débil y disminuyó cuando se aumentó el contenido de PVA en las muestras, de esta manera nos indica el enlace del QS con el PVA en las fibras con una composición al 8% (Koosha & Mirzadeh 2015), el pico de 850 cm^{-1} corresponde al enlaces C-H que disminuyó al aumentar el contenido de QS en las muestras, el pico en 1090 corresponden a las vibraciones de los enlaces C-O de las fibras que contienen PVA, este pico aparece con un hombro y es sensible a la cristalización del PVA, sin embargo no se observó un cambio significativo en esta banda, el pico en 1250 cm^{-1} está relacionado con las vibraciones de estiramiento C-H. Las bandas a 1379 y 1434 cm^{-1} son vibraciones de O-H y C-H para el PVA respectivamente (Habiba *et al.*, 2015) y 1733 cm^{-1} que están relacionadas con las vibraciones de estiramiento de C=O de las unidades de repetición de acetato de vinilo restantes en el PVA (Yang *et al.*, 2018). El pico a 2940 cm^{-1} está relacionado con enlaces antisimétrico CH_2 . Ambos picos fueron reducidos al aumentar el contenido de QS en las microfibras (Carvalho *et al.*, 2017).

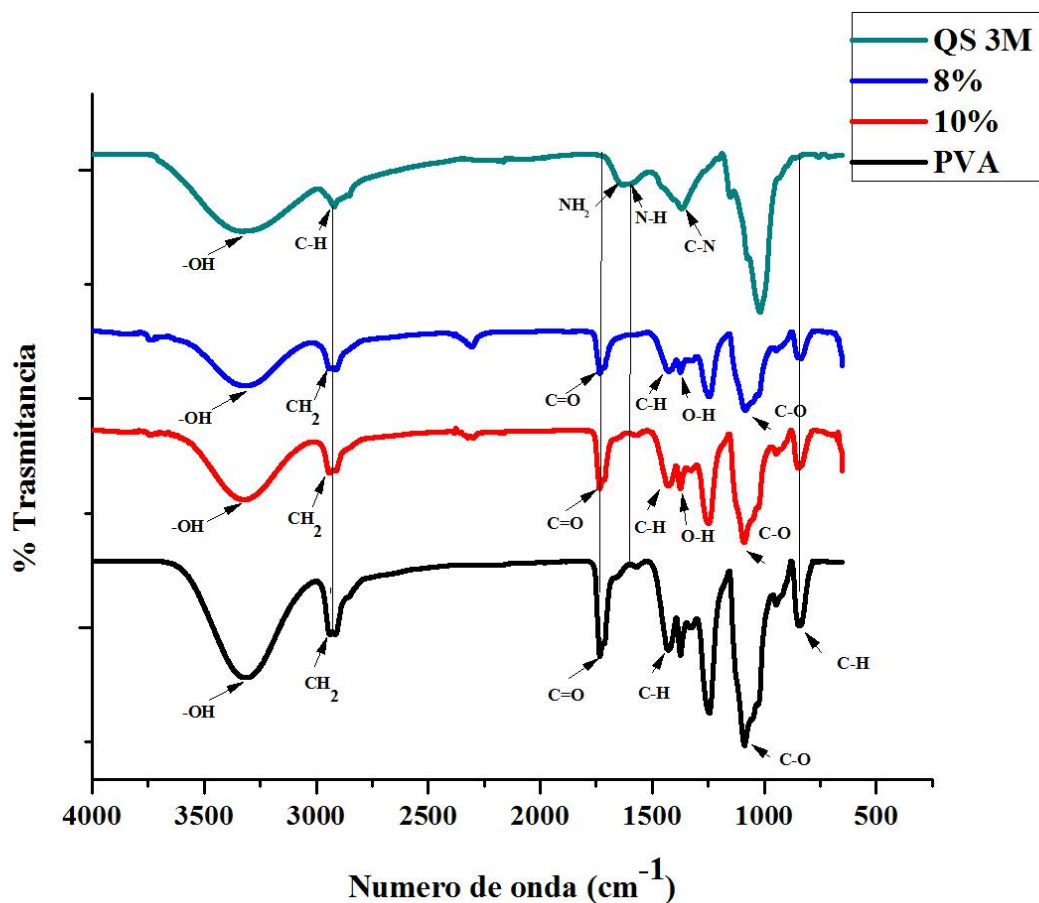


Figura 3.22. Espectros FT-IR de microfibras sólidas QS / PVA.

Los resultados de la espectroscopia FTIR de las microfibras presentados en la Figura 3.22. Confirman la miscibilidad parcial de las mezclas QS/PVA debido a la diferencia de los espectros de los polímeros puros, dado que el cambio en el número de onda y la forma de los picos fue una evidencia de interacciones de enlaces de hidrógeno entre el QS y el PVA.

Espectroscopia Raman de las microfibras.

En el espectro Raman de una concentración de QS al 8% se observa un pico a 3302 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de los grupos N-H, sin embargo la relación de 35QS/65PVA y fibra de PVA no presento dicho pico, esta banda coincide con lo reportado por Zhang *et al.*, (2010). La intensidad a 2888 cm^{-1} corresponde a las vibraciones C-H de estiramiento del anillo piranoso (Zajac *et al.*, 2015), la banda a 1620 cm^{-1} se presenta la deformación de N-H de amidas y las vibraciones de estiramiento de C=C, el pico localizado

a 1492 cm^{-1} a vibración de tijera C-H (Jha *et al.*, 2013). A 952 cm^{-1} vibraciones C-N (Zajac *et al.*, 2015).

Para el espectro Raman de las microfibras PVA se puede observar una banda intensa a 2900 correspondiente al grupo CH_2 (Kozai *et al.*, 2012), otra menos intensa y ancha en 3400 cm^{-1} correspondiente al grupo OH (Rudko *et al.*, 2015), los picos a 1358 y 1437 cm^{-1} que corresponden a la flexión C-H y O-H (Barzegar *et al.*, 2015). Los picos a 915 y 851 cm^{-1} corresponden a los estiramientos C-C. Como se puede observar en la Figura 3.23 la relación 35QS/65PVA es más parecida a la fibra de PVA dadas las condiciones a las cual fue preparada.

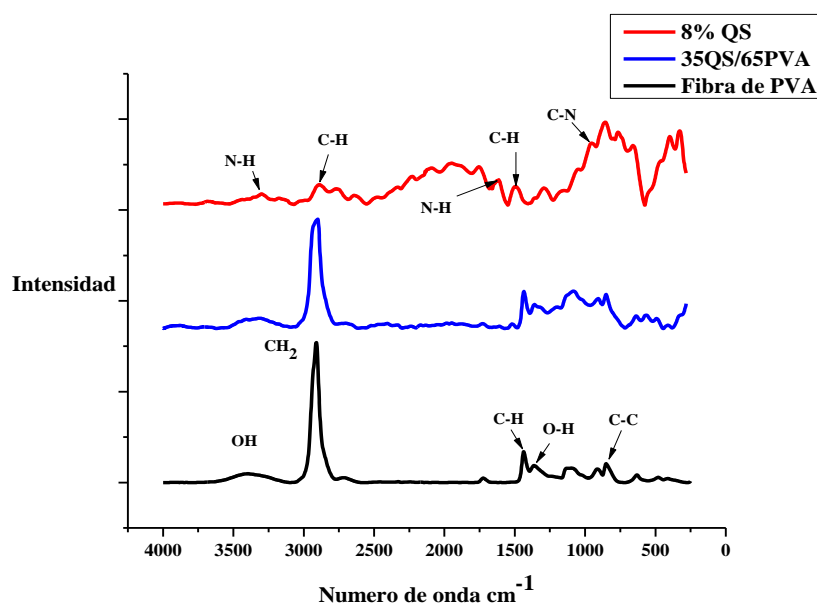


Figura 3.23. Espectroscopia Raman microfibras.

Calorimetría Diferencial de barrido de las microfibras (DSC).

Las mediciones DSC pueden proporcionar datos valiosos sobre el comportamiento térmico y las transiciones de fase dentro de los materiales. La transición vítrea y la fusión son dos fenómenos importantes en los polímeros, que se ven afectados por las condiciones de procesamiento y los aditivos presentes en el material (Koosha & Mirzadeh, 2015).

La microfibra de PVA pura muestra una curva endotérmica relativamente grande y aguda con un pico a 191°C . Sin embargo, para las microfibras de mezcla QS/PVA, la misma curva

se volvió un poco ancha y el pico se desplazó cuando la temperatura fue baja. Esto indica que la microestructura cristalina de las fibras electrohiladas no se desarrollaron bien. Esto se debió a que la mayoría de las cadenas están en el estado no cristalino debido al rápido proceso de solidificación de las cadenas estiradas durante el electrohilado con esto se demuestra que el contenido de QS en la mezcla deterioro la cristalización de la fibra (Yong-Tang *et al.*, 2007).

La adición de QS dentro de la estructura reduce el calor de fusión que conduce a la ampliación del pico dificultando así el desarrollo de la estructura cristalina. Esto se cree que es debido a la disminución de la asociación ordenada de cadenas de polímero de PVA que resultan de enlaces de hidrógeno entre los grupos -OH de PVA y -OH y -NH₂ grupos de QS que se produce en el estado amorfo (Çay *et al.*, 2014).

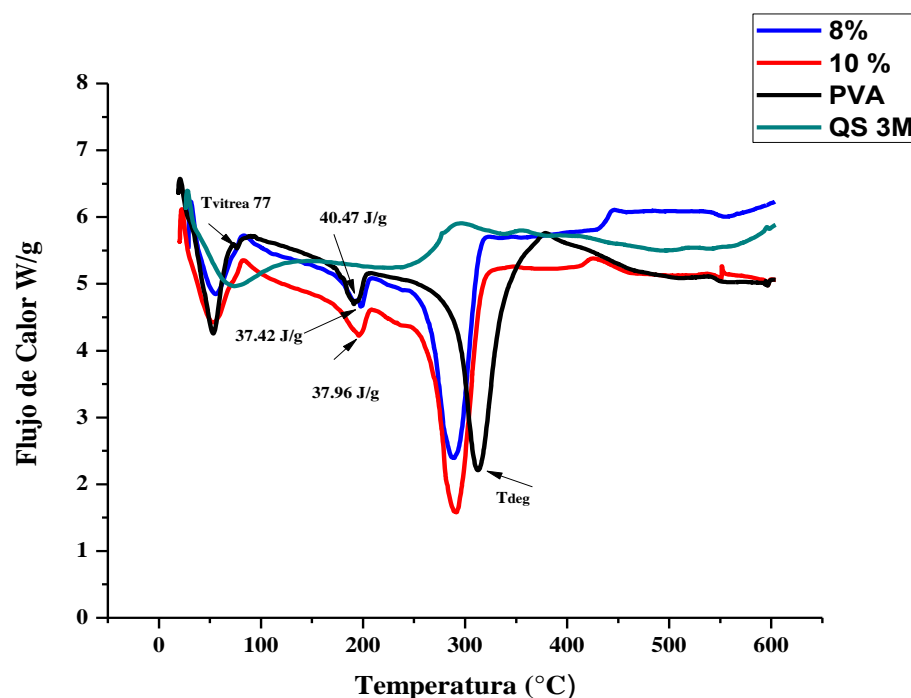


Figura 3.24. Termograma DSC de microfibras QS/PVA sólidas.

En los termogramas a una composición al 10 y 8% aparece un pico ancho desde el inicio de la prueba y finaliza hasta 83.05°C este pico se relaciona con la evaporación de los disolventes (agua y ácido acético) dentro de estructura del QS, cercano a la temperatura de ebullición del ácido acético (118°C) como se reporta en la literatura. La microfibras de PVA presento un pico a 77.28 °C correspondiente a la temperatura de transición vítrea, sin embargo este pico

no se presentó para las mezclas de QS/PVA solidas posiblemente porque el contenido de PVA disminuyó en las microfibras, es importante destacar que las entalpias de fusión disminuyeron para las microfibras al 10 y 8 % (37.96 y 37.42 J/g) respectivamente, al ser comparada con la entalpia de fusión de la microfibras de PVA puro de 40.47 J/g demostrando que el contenido de QS tiene influencia en la cristalización de las microfibra.

Al aumentar la temperatura las microfibras comienzan a degradarse con diferentes comportamientos, en la Figura 3.24 se observó que para el PVA su proceso de degradación ocurrió a temperaturas superiores a 300°C con un pico endotérmico, esto se debe a la absorción de calor del PVA que experimenta durante la transición de fase de sólido a líquido, para el caso de las microfibras que contenían QS mostraron de la misma un forma un pico endotérmico por el contenido de PVA presente en las microfibras y llegó a disminuir su temperatura de degradación a 296°C para una concentración al 8%.

Análisis Termogravimétrico de las microfibras.

Los perfiles TGA de las microfibras obtenidas se muestran en la Figura 3.25. Para una composición al 8% se observan dos perdidas de peso, una es la eliminación de grupos laterales del PVA aproximadamente 242 °C y otra es la descomposición de la cadena principal del polímero a aproximadamente a 401° C, es debida a la descomposición del PVA. En el caso de la microfibra de 35QS, de forma similar, se observaron dos etapas de pérdida de peso (Yang *et al.*, 2018).

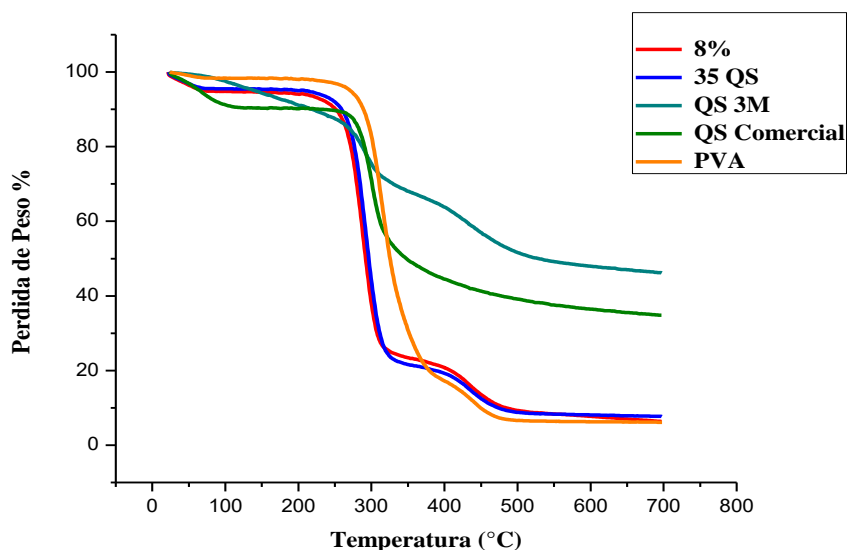


Figura 3.25.TGA microfibras QS / PVA.

La primera pérdida de peso apareció a aproximadamente 69°C debido a la evaporación de la humedad del agua absorbida y el ácido acético residual (Choo *et al.*, 2016). El QS 3M mostró la mayor pérdida de peso, que es de alrededor del 13.72% este porcentaje nos indica que tiene un mayor contenido de agua. Mientras tanto, la microfibra de PVA mostró la menor pérdida de peso, que es solo de 1.86% dado que el contenido de agua es bajo (El-Hefian, *et al.*, 2011). A 240-300°C, una pérdida importante de peso en las muestras, que es atribuida a la rápida descomposición de las microfibras de PVA y QS (Khan *et al.*, 2012). La tercera pérdida de peso ocurrió a 320-500°C. Esto se debe a la degradación de los subproductos generados por el PVA durante su degradación térmica (Bonilla *et al.*, 2015).

Conclusiones

- Con base a la literatura (New *et al.*, 2010) el mayor rendimiento de QS obtenido por el método químico es empleando una concentración 11M de NaOH (1.74 g/100 g de micelio), sin embargo esta concentración es altamente corrosiva, difícil de manejar y ocasiona daños ambientales en cuanto a residuos. Otra metodología propuesta es utilizar una concentración de 1 M de NaOH, como se reporte en la Tabla 1.1; bajo estas condiciones su rendimiento es bajo. Motivo por el cual se realizó una prueba adicional (3M) para hacer eficiente el proceso de desacetilación.
- Los rendimientos obtenidos fueron 0.86, 0.41 y 0.34 en porcentaje respectivamente para las concentraciones 11, 3 y 1 M de NaOH, pero como ya se mencionó anteriormente para fines de aplicación biomédica es importante el grado de desacetilación, como se muestra en la Tabla 3.6 fue más alto el de 3M, caracterizado por microscopia infrarroja y valoración potenciométrica de tal manera fue mejor utilizar el obtenido por 3M.
- Desde el punto de vista medioambiental, la extracción el QS por el método químico involucra el uso de altas concentraciones de soluciones alcalinas y consecuentemente de los respectivos lavados sucesivos con agua destilada para neutralizar el producto final (0.17 gr QS por 15L). Esto implica un problema en cuanto al tratamiento de desechos del proceso. Por ello, la metodología propuesta para la obtención de las microfibras es la eliminación de la etapa de precipitación, con lo que se reduce el uso de soluciones alcalinas y con ello la cantidad de agua necesaria para la neutralización del producto.
- Una segunda ventaja del proceso propuesto consiste en la adición del PVA en estado sólido en la etapa de solubilización del QS, que conlleva una menor pérdida del biopolímero para la formulación de la solución a electrohilar que de otro modo el QS tendría que ser precipitado, secado (convectivo), molido, tamizado y solubilizado nuevamente en ácidos diluidos para su mezclado con PVA, reduciendo su concentración en la microfibra. Todo lo anterior implica un ahorro en cuanto al uso de agua y demanda de energía eléctrica.
- Las condiciones adecuadas para producir microfibras de QS/PVA a partir del proceso de electrohilado es aplicando un potencial de 26 kV y una distancia de 20 cm.

- Se obtuvieron películas de QS del hongo *Pleurotus ostreatus* conformadas por electrohilado, con microfibras de diámetro promedio de 249 nm.
- Disminuyeron los diámetros de fibra de las microfibras electrohiladas de QS / PVA con el aumento de solución QS.
- Los resultados de la espectroscopia FTIR de las microfibras confirman la miscibilidad parcial de las mezclas QS/PVA debido a la diferencia de los espectros de los polímeros puros, dado que el cambio en el número de onda y la forma de los picos fue una evidencia de interacciones de enlaces de hidrógeno entre el QS y el PVA.
- Se observó una disminución en la entalpia de fusión de las microfibras 37.96 y 37.42 J/g comparada con la entalpia de fusión de la microfibra de PVA puro de 40.47 J/g, demostrando que el contenido de QS tiene influencia en la cristalización de la fibra.
- La temperatura de degradación de las microfibras (293 °C) disminuyó en comparación con la fibra de PVA puro (315 °C) indicando la presencia de QS.

Bibliografía

- A.O.A.C.(1995). Official Methods of Analyssis. En A. Virginia, Association of Official Analytical Chemists International 16 th edition, E.U.A.
- Akbar, E., &Aghababai B.A. (2014). A novel fixed-bed reactor design incorporating an electrospunPVA/chitosan nanofiber membrane. *Journal of Hazardous Materials* 280, 788–796.
- Alireza, R.S., Mohammadi, S.Z., Yazdi, F., Isaei, S.E. (2016). Biocompatible Electrospinning Chitosan Nanofibers: A Novel Delivery System with Superior Local Cancer Therapy, *Carbohydrate Polymers*.
- Alzate, F.L., Cuervo, A.R., Valencia, E.M. (2015). Extracción y caracterización de quitosano fúngico experimental y comercial, como potencial biomaterial para aplicaciones en ingeniería de tejido. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 16(2), 112-124.
- Ahmed, S., & Ikram, S. (2016). Achievements in the Life Sciences Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. *Achievements in the Life Sciences*, 10(1), 27–37.
- Aranaz, I., Mengfbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Acosta., & Heras, Á. (2009). Functional Characterization of Chitin and Chitosan, *Current Chemical Biology*, 3(2), 203–230.
- Arbia, W., Arbia, L., Adour, L., Amrane, A. (2013). Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods – A Review. *Food Technol. Biotechnol*, 51 (1) 12-25.
- Babitha, S., Rachita, L., Karthikeyan, K., Shoba, E., Janani, I., Poornima, B., Sai, K.P. (2017). Electrospun protein nanofibers in healthcare: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 523, 52-90.
- Balagangadharan, K., Dhivya, S., Selvamurugan, N. (2016). Chitosan based nanofibers in bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Balanta, D., Grande, C. D., & Zuluaga, F. (2010). Aplicaciones como Material Bioadsorbente en el Tratamiento de Aguas, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 11(5), 297–316.
- Barzegar, F., Bello, A., Fabiane, M., Khamlich, S., Momodu, D., Taghizadeh, F., Dangbegnon, J., Manyala, N. (2015). Preparation and characterization of poly(vinylalcohol)/graphene nanofibers synthesized by electrospinning. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 77, 139–145
- Barrera, J. E., Rodríguez, J.A., Perilla, J.E., Algecira, N.A. (2007). Estudio de la degradación térmica de poli(alcohol vinílico) mediante termogravimetría y termogravimetría diferencial. *Revista Ingeniería e Investigación*, 27, 100-105.
- Baxter, A., Dillon, M., Taylor, K. D. A. (1992). Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol*. 14, 166-169.
- Becerra-Jimenez, J.M., Valdivia-Urdiales, B., Aguilar C.N, Martínez-Hernández, J.L., Contreras-Esquivel J.C., & Cuellar Lozano C.A. (2011). Quitosano Fúngico: Fuentes y Propiedade. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 3(5), 24-32.

- Biazar, E., Zaeifi, D., Keshel, S. H., Ojani, S., Hajiaghaee, A., Safarpour, R., Sheikholeslami, M., Heidari, B., Sadeghpour, S. (2015). Design of Electrospun Poly vinyl alcohol/Chitosan Scaffold and Its Cellular Study, *Journal of Paramedical Sciences*, 6.
- Bognitzki, M., Czado, W., Frese, T., Schaper, A., Hellwig, M., Steinhart, M., Greiner, A., Joachim H. Wendorff, H.J. (2001). Nanostructured Fibers via Electrospinning. *Advance Materials*, 13(1), 70-72.
- Bonilla, J., Fortunati, E., Atarés, L., Chiralt, A., Kenny, J.M. (2014). Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol-chitosan biodegradable films. *Food Hydrocolloids*. 35,463-470.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., & Argu, Desbrie, J, Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, *Polymer*, 42, 3569-3580.
- Cano, F., Tornero., A., & Naik, A. (2010). Produccion de nanofibras a partir de un diseño innovador de maquinaria prototipo de electrospinning. *Boletin Intexter (UPC)*, 5-11.
- Carvalho, A.A., Waitman O.S.F., Colque, J.T., Moura S.V., Prieto, T., Everaldo, C.V., Bonvent, J.J.(2017). Tetracycline hydrochloride-loaded electrospun nanofibers mats based on PVA and chitosan for wound dressing. *Materials Science and Engineering C*, 77, 271-281.
- Çay, A., Miraftab, M., & Akçakoca, E. P. (2014). Characterization and swelling performance of physically stabilized electrospun poly (vinyl alcohol)/ chitosan nanofibres. *European Polymer Journal*, 61, 253–262.
- Ceballos-Ortiz, E.M., & Jiménez –Munguía, M.T. (2012). Cambios en las propiedades de frutas y verduras durante la deshidratación con aire caliente y su susceptibilidad al deterioro microbiano. *Temas selectos de Ingeniería en Alimentos*. 6-1,98-100.
- Ciappini, M. C., Gatti, B., López Zamora, M. L. (2004). Pleurotus ostreatus, una opción en el menú. estudio sobre las gírgolas en la dieta diaria. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*. 7,127-132.
- Delgado, F. B.I. Práctica experimental Identificación de aminoácidos y proteínas.
- Diaz del Castillo, F., 2012. Introducion a los nanomateriales, Estado de Mexico. Facultad de estudios superiores Cuatitlan (UNAM). Departamento de Ingenieria. Laboratoria de tecnologia de materiales.
- Dong, Y., Xu, C., Wang, J., Wang, M., Wu, Y., & Ruan, Y. (2001). Determination of degree of substitution for N-acylated chitosan using IR spectra. *Science in China*, 216-224.
- Dutta, P. K., Dutta, J., & Tripathi, V. S. (2004). Chitin and chitosan : Chemistry , properties and applications, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63, 20–31.
- Elsabee, M.Z., Naguib, H.F., Morsi, R.E. (2012). Chitosan based nanofibers, review. *Materials Science and Engineering C*. 32, 1711–1726.
- Erickson, A. E., Edmondson, D., Chang, F., Wood, D., Gong, A., Levengood, S. L., & Zhang, M. (2015). High-throughput and high-yield fabrication of uniaxially-aligned chitosan-based nanofibers by centrifugal electrospinning. *Carbohydrate Polymers*, 134, 467–474.

- Escobar, S. D. M., Castro R, A. M., Vergara, C. N. A. (2013). Determinación de la relación entre el porcentaje del grupo amino y el grado de desacetilación del quitosano Grado Grado de N de – N acetilación, *Revista de Ciencias*, 73–88.
- Escobar S. D.M., Ossa, O. C.P., Quintana, M.A., Ospina, W.A. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. *Scientia et Technica*. 18(1), 260-266.
- FarmaIndustria, D. d. (Septiembre de 2014). <http://www.medicamentos-innovadores.org/>. Recuperado el 20 de Febrero de 2015, de <http://www.medicamentos-innovadores.org/sites/default/files/medinnovadores/Espa%C3%B1ol/Investigaci%C3%B3n%20Farmac%C3%A9utica/2013/Resultados%20Encuesta%20I%2BD%202013-D%20%28final%29.pdf>.
- Fathia, M., Martin, A., McClements, D.J. (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems, *Trends in Food Science & Technology*, 39, 18-39.
- Flores-Reyes, M., Camarillo-Romero, M.S., Flores-Estrada, J., & Flores-Merino, M.V. (2015). Sustitutos de piel poliméricos para el tratamiento de úlcera en pie diabético. *Medicina e Investigación*. 3(1),74-78.
- Fong, H., Chun, I., & Reneker, D.H. (1999). Beaded nanofibers formed during electrospinning, *Polymer*, 40(16), 4585-4592.
- Gaitán, H., Salmones, D., Pérez, M.R., Mata, M. (2006). Manual Práctico del cultivo de setas.
- Gamboa, W., Mantilla, O. & Castillo, V. (2007) Producción de micro y nano fibras a partir de la técnica de “electrospinning” para aplicaciones farmacológicas, Habana, Cuba. Fundación Cardiovascular de Colombia. Grupo Bioingeniería.
- García, Z. T., Roca, O., & Johana, M. (2008). Industrialización de los crustáceos para la obtención de Quitosano en ungüento con efecto cicatrizante. *Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial*, 11(2), 24-32.
- Grant, N., Zhang, H. (2011). Poorly water-soluble drug nanoparticles via an emulsion-freeze-drying approach. *J. Colloid Interface Sci.*, 356, 573–578.
- Habiba, U., Siddique, T.A., Talebian, S., Lee, J.JL., Salleh, A., Ang, B.C., Afifi, A.M. (2017). Effect of deacetylation on property of electrospun chitosan/PVA nanofibrous membrane and removal of methyl orange, Fe(III) and Cr(VI) ions. *Carbohydrate Polymers*, 177, 32-39.
- Haider, S., Al-Zeghayer, Y., Ahmed Ali, F.A., Haider, A., Mahmood, A., Al-Masry, W.A., Imran, M., & Aijaz, M.O. (2013). Highly aligned narrow diameter chitosan electrospun nanofibers. *J Polym Res*. 105.
- Haider, A., Haider, S., Kang, I. (2015). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*, 1-24.
- Hernández, I. (2004). Revisión bibliográfica La Quitosana: Un Producto Bioactivo de Diversas Aplicaciones, *Cultivos Tropicales*, 25(3),97-110.
- Ikeda, I.; Sugano, M.; Yoshida, K.; Sasaki, E.; Iwamoto, Y. & Hatano, K. (1993). Effect of

- chitosan hydrolysates on lipid absorption and on serum and liver lipid concentration in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 431–435.
- Jalvandi, J., White, M., Gao, Y., Bach, Y., Padhye, R., & Louis, I. (2017). Polyvinyl alcohol composite nano fibers containing conjugated levofloxacin-chitosan for controlled drug release. *Materials Science and Engineering C*, 73, 440–446.
- Jha, K.P., Halada, P.G., & McLennan, M.S. (2013). Electrochemical Synthesis of Nitro-Chitosan and Its Performance in Chromium Removal. *Coatings*, 3, 140-152.
- Jia Y-T, Gong J, Gu X-H, Kim H-Y, Dong J, Shen X-Y. (2007) Fabrication and characterization of poly(vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method. *Carbohydrate Polymers*, 67, 403-9.
- Jiang, T., Carbone, E. J., & Lo, K. W. (2015). Progress in Polymer Science Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration. *Progress in Polymer Science*, 46, 1–24.
- Kang, H., Zhu, Y., Jing, Y., Yang, X., Li, C. (2010). Fabrication and Electrochemical Property of Ag-Doped SiO₂ Nanostructured Ribbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 356, 120.
- Kanani, A.G., & Bahrami, S.H. (2011). Effect of Changing Solvents on Poly(ϵ Caprolactone) Nanofibrous Webs Morphology. *Journal of Nanomaterials*.
- Kasaai, M., R. (2008). A review of several report procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 71, 497-508.
- Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 3–11.
- Kim, I., Seo, S., Moon, H., Yoo, M., Park, I., Kim, B., & Cho, C. (2008). Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 26, 1–21.
- Kittur, F.S., Prashanth, K.V.H., Sankar, K.U., Tharanathan, R.N. (2002). [Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry](#) *Carbohydrate Polymers*. 49, 185-193.
- Kittur, F. S., Vishu Kumar, A. B., & Tharanathan, R. N. (2003). Low molecular weight chitosans – preparation by depolymerization with *Aspergillus niger* pectinase, and characterization. *Carbohydrate Research*, 338(12), 1283–1290.
- Knidri, H.E., El Khalfaouy, R., Laajeb, A., Addaou, A., Lahsini, A. (2016). Eco-friendly extraction and characterization of chitin and chitosan from the shrimp shell waste via microwave irradiation. *Process Safety and Environmental Protection*. 104, 395–405.
- Koombhongse, S., Liu, W., Reneker, D.H. (2001). Flat Polymer Ribbons and Other Shapes by Electrospinning, *Flat polymer ribbons and other shapes*, 44325-3909.
- Koosha, M., Hamid Mirzadeh, H. (2015). Electrospinning, mechanical properties, and cell behavior study of chitosan/PVA nanofibers. *Society For Biomaterials*, 3081-3093.
- Kozai, T., Yamashita, S., Hirochi, K., Miyagawa, H., Tsurumachi, N., Koshiba, S., Nakanishi, S., Itoh, H. (2012). Molecular vibrational dynamics in polyvinyl alcohol

- studied by femtosecond coherent Anti-Stokes Raman spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 553, 26-29.
- Kumar B., Varadaraj M., Tharanathan R. (2007). Low Molecular Weight Chitosans Preparation with the Aid of Pepsin, Characterization, and Its Bactericidal Activity. *Biomacromolecules*, 8, 566-572.
- Kumirska J., Czerwicka M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming J., and Stepnowski, P. (2010). Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan, *Marine Drugs*, 8(5), 1567-1636.
- Kumirska, J., Weinhold, M.X., Thöming, J., Stepnowski, P. (2011). Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials—Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of *N*-Acetylation. *Polymers*, 3 1875-1901.
- Libardo, R.P.E. (2011). Obtención de hidrogeles de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger* y su estudio en la liberación controlada de cafelexina. Tesis de licenciatura.
- Loera Serna, S., Ruiz Angeles, J., Flores Moreno, J., & Soto Portas, L. (2012). Protegiendo fármacos con nanomateriales inteligentes. *Mundo Nano UNAM*, Vol. 5 No. 1.
- Madene, A.J. (2006). Flavour encapsulation and controlled release a review. *International Journal Food Science & Technology*, 1-21.
- Marcela, L., Sánchez, D., Rodríguez, L., & López, M. (2014). Electrospinning: La era de la nanofibras, *Iberoamericana de Polimeros*, 14(1), 10–27.
- Martínez-Carrera, D., Curvetto, M., Sobal, P.M., Mora V.M. (2010). Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción- Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el siglo XXI. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales- COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla
- Matabola, K.P., & Moutloali, R.M. (2013). The influence of electrospinning parameters on the morphology and diameter of poly(vinylidene fluoride) nanofibers- effect of sodium chloride. *J Mater Sci*.
- Maza, M.I., & Hernandez C.J. (2007). Caracterización Físicoquímica de Quitosano para su aplicación como Biosorbente de Metales, *Revista de la facultad de ciencias de la UNI*, 11(1), 1-5.
- Megelski, S., Stephens, J.S., Chase, D.B., & Rabolt, F.J. (2002). Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. *Macromolecules*. 35, 8456-8466.
- Merino, D., Mansilla, Y., Casalengué, C., Alvarez, V. (2016). Propiedades físicoquímicas y antibacteriales de mezclas de PLA-Quitosano obtenidas por casting con potencial uso como acolchonados agrícolas. *Avances en Ciencias e Ingeniería*. 7(1), 27-39.
- Methacanona, P., Prasitsilp, M., Pothsree, T., & Pattaraarchachai, J. (2003). Heterogeneous *N*-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Polymers*, 52, 119–123.
- Moinard, C., Chevalier, D., Beney, L., Fessi, H. (2008). Mechanism of nanocapsules

- formation by the emulsion-diffusion process. *Journal of Colloid and Interface Science*, 317, 458-468.
- Mohamed, M.G., Sabha, M.E., Marwa, A.S., Osama, M.D. (2015). Production of chitosan from different species of zygomycetes and its antimicrobial activity. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 123-130.
- Moussout, H., Ahlafi, H., Aazza, M., Bourakhouadar, M. (2016). Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis. *Polymer Degradation and Stability*. 130, 1-9.
- Nandana, B., & Subhas, C. K. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* 28, 325–347.
- Nagihan, O., Pinar, T. & Filiz, A. (2014) Affecting parameter on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocolloids*, 29, 19-25.
- Navideh, A., Nehdi, I.A., Sbihi, H.M., Al-Resayes, S.I Malmiri, H.J., & Tan, C.P. (2014). Preparation of Astaxanthin Nanodispersions Using Gelatin-Based. Stabilizer System. *Molecules*, 9, 14257-14265.
- Nwe, N., Furuike, T., & Tamura, H. (2010). Production of Fungal Chitosan by Enzymatic Method and Applications in Plant Tissue Culture and Tissue Engineering : 11 Years of Our Progress , Present Situation and Future Prospects, *Biopolymers*, 50–57.
- Ohkawa, K., Kim, H., Lee, K., Yamamoto, H. (2004). Electrospun non-woven fabrics of poly(ε-caprolactone) and their biodegradation by pure cultures of soil filamentous fungi. *Macromol Symp*, 216, 301–6.
- Ohkawa, K., Cha, D., Kim, H., Nishida, A., Yamamoto, H. (2004). Electrospinning Chitosan, *Macromoleculares*, 25, 1600-1605.
- Pakravan, M., Heuzey, M.C., Ajji, A. (2012). Core – Shell Structured PEO-Chitosan Nanofibers by Coaxial Electrospinning, *Biomacromolecules*, 13, 412-421.
- Pangburn SH, Trescony PV, Heller J. (1982). Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogel, *Biomaterials*, 3(2), 8-105.
- Paipitaka, K., Pornprac, P. T., Mongkontalang, W., Techitdheera, W. (2011). Characterization of PVA-Chitosan Nanofibers Prepared by Electrospinning, *Procedia Engineering*, 8, 101-105.
- Pillai, C.K.S., Paul, W., Sharma, C.P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 34, 641–678.
- Pinho, E. D., Martins, A., & Arau, J. V., Reis, R. L., Neves, N. M. (2009). Degradable particulate composite reinforced with nanofibres for biomedical applications, *Acta Biomaterialia*, 5, 1104–1114.
- Pochanavanich, P., & Suntornsuk, W. (2002). Fungal chitosan production and its characterization. *Letters in Applied Microbiology*. 35, 17–21.
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol*. 25: 78-82.
- Prochazkovab, S., Vårum, K.M., & Østgaard, K. (1999). Quantitative determination of

chitosans by ninhydrin. *Carbohydrate Polymers*, 38, 115-122.

- Pulido, A.Y. (2010). Encapsulación de ácido ascórbico mediante secado por aspersión utilizando quitosano como material de pared. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 189-195.
- Puppi, D., Piras, A. M., Detta, N., Ylikauppi, H., Nikkola, L., Ashammakhi, N., Chiellini, F., & Chiellini, E. (2011). Poly(vinyl alcohol)-based electrospun meshes as potential candidate scaffolds in regenerative medicine. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 26(1), 20–34.
- Rafique, A., Mahmood Zia, K., Zuber, M., Tabasum, S., & Rehman, S. (2016). Chitosan functionalized poly(vinyl alcohol) for prospects biomedical and industrial applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 141–154.
- Rao-Chi, C., Ming-Tsung, Y., & Jeng-Leun M. (2016). Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake estipes, compared to commercial chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 138, 259–264.
- Reza Avadi, M.S.T. (2010) Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine, Nanotechnology, Biology and Medicine*, 58-63.
- Richardson-Simon, C. W., Kolbe-Hanno, V. J., & Duncan, R. (1999). Potentials of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: Biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. *International Journal of Pharmaceutics*, 178, 231–243.
- Rico, R. F. (2013). Estudio de la aplicación de recubrimientos comestibles de quitosano y su combinación con aceites esenciales sobre la vida útil del mango (*Mangifera indica L.*) mínimamente procesado. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.
- Roberts, A.D., Zhang, H. (2013). Poorly water-soluble drug nanoparticles via solvent evaporation in water-soluble porous polymers. *Int. J. Pharm.*, 447, 241–250.
- Rodríguez-Pedroso, A.T., Ramírez-Arrebató, M.A., Rivero-González, D. E. Bosquez-Molina, E., Barrera-Necha, L.L & Bautista-Baños, S. (2009). Propiedades Químico-Estructurales y Actividad Biológica de la Quitosana en Microorganismos Fitopatógenos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 15(3), 307-317.
- Roya, S., Alireza, S., Zohreh, M., Samadi, F. Y., Elham, I. (2016). Biocompatible Electrospinning Chitosan Nanofibers: A Novel Delivery System with Superior Local Cancer Therapy. *Carbohydrate Polymers*.
- Rudko, Y.G., Kovalchuk, O.A., Fediv, I.V., Chen, M. W., Buyanova A.I. (2015). Interfacial bonding in a CdS/PVA nanocomposite: A Raman scattering study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 452, 33-37.
- Salas de la Torre, N., Bazán, A., Osorio, O., Carrero C. E. (2003). Deshidratación de hongos comestibles (*Pleurotus Ostreatus*). *Rev. Per. Quim. Ing. Quim.* 6, 55-59.

- Sandoval Aldama, A., Rodriguez Sandoval, E. & Ayala Aponte, A., 2004. Encapsulacion de aditivos para la industria de alimentos. *Revista Cientifica y Tecnologica de la Universidad del Valle*, 5, 73-83.
- Shahidi, F. (1999). Food applications of chitin and chitosans, *Trends in Food Science & Technology* 10, 37-51.
- Shigemasa, Y., Matsuura, H., Sashiwa, H., Saimoto, H. (1996). Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 237-242.
- Solange, C.S., Zuluaga, F., Valencia, C., Godoy, J.E. Elaboración de Andamios Porosos Osteoinductivos de Poli (Ácido L-Láctico)/Quitosano Para Regeneración de Tejido Óseo. *Revista Colombiana de Materiales*. 6, 34-53.
- Suyatma, N.E., Copinet, A., Tighzert, L., Coma, V. (2004). Mechanical and Barrier Properties of Biodegradable Films Made from Chitosan and Poly (Lactic Acid) Blends, *Journal of Polymers and the Environment*, 12(1), 1-6.
- Suyatma, N.E., Copinet, A., Coma, V. & Fricoteaux, F. (2010). Compatibilization method applied to the chitosan-acid poly (L-lactide) solution. *Journal of applied polymer science*, 117 (5), 3083-3091.
- Suyatma, N.E., Copinet, A., Legin-Copinet, E., Fricoteaux, F., Coma, V. (2011). Different Pla Grafting Techniques on Chitosan. *J Polym Environ*. 19,166–171.
- Takanori, S., Keisuke K., & Yoshio I. (1976). Studies on chitin, 2 *. Effect of deacetylation on solubility. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 177(12), 3589-3600.
- Wang, W., Du, Y., Qiu, Y., Wang, X., Hu, Y., Yang, J., Cai, J., Kennedy, J.F. (2009). A new green technology for direct production of low molecular weight chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 74,127–132.
- Wessels, J. G. H., Mol. P. C., Sietsma, J. H. & Vermeulen, C. A. (1990). Wall structure, wall growth, and fungal cell morphogenesis. *Biochemistry of cell walls and Membranes in fungi*, Kuhn, P. J., Trinci, A. P. J., Jung, M. J., Goosey, M. W. & Copping, L. G. 81-95, Springer-Verlag, Berlin.
- Wu, T. (2004). Production and Characterization of Fungal Chitin and Chitosan. Thesis, 1-65.
- Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F.A., Conway, W.S. & Sams, C.E. (2005) Physicochemical Properties and Bioactivity of Fungal Chitin and Chitosan, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3888-3894.
- Yang, S., Lei, P., Shanb, Y., Zhanga, D. (2018). Preparation and characterization of antibacterial electrospun chitosan/poly (vinyl alcohol)/graphene oxide composite nanofibrous membrane. *Applied Surface Science*, 435, 832–840.
- Yeo, Y., Baek, N., & Park, K. (2001). Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6, 213-230.
- Yong-Tang, J., Gong, J., Xiao-Hua, G., Hark-Yong, K., Dong, J., Xin-Yuan, S. (2007). Fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan blend nanoWbers produced by electrospinning method, *Carbohydrate Polymers*. 67, 403–409.

- Zajac, A., Hanuza, J., Wandas, M., Dymińska, L. (2015). Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 134, 114-120.
- Zhang, K., Helm, J., Peschel, D., Gruner, M., Groth, T., Fischer, S. (2010). NMR and FT Raman characterisation of regioselectively sulfated chitosan regarding the distribution of sulfate groups and the degree of substitution. *Polymer*, 51 4698-4705.
- Zhang, Y., Qian, J., Ke, Z., Zhu, X., Bi, H., Nie K. (2002). Viscometric study of poly (vinyl chloride)/poly (vinyl acetate) blends in various solvents. *Europe Polymer*; 38, 333–7.

ppppp