

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa



Estudio de la funcionalización de textil de celulosa mediante entrecruzamiento con quitosano, quitooligosacáridos y microcápsulas de quitosano y evaluación de las propiedades antimicrobianas.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A:

Diana Alonso Segura

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Asesores:

Dr. Miquel Gimeno Seco¹

Dr. Roberto Olayo²

¹ Facultad de Química, Departamento Alimentos y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

² División Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Junio 2009

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el No. de Registro **175910**”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de CONACyT. Asimismo agradezco a la Unión Europea y al CONACyT por los financiamientos otorgados a través del proyecto Alfa Polylyfe y a los apoyos integrales para la Formación de Doctores en Ciencias 2006-2007 para realizar las siguientes acciones de movilidad:

- Estancia de investigación por 2 meses en el Instituto de Estudios Biofuncionales de la Universidad Complutense de Madrid para la caracterización de quitosanos comerciales.
- Estancia de investigación por 2 meses en la Universidad de Potsdam, Alemania para la caracterización de quitolígomeros comerciales.
- Asistencia al curso “Biopolymers in materials and life sciences: a course for training of graduate and postgraduate students” realizado en la Universidad de Potsdam, Alemania con duración de 1 mes.

México, D.F. a 8 de Junio del 2009.

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

Estudio de la funcionalización de textil de celulosa mediante entrecruzamiento con quitosano, quitooligosacáridos y microcápsulas de quitosano y evaluación de las propiedades antimicrobianas.

Que presentó:

Diana Alonso Segura

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología Laboratorio de Biopolímeros.

Asesor: Dr. Miquel Gimeno Seco
Facultad de Química, Departamento Alimentos y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor: Dr. Roberto Olayo González
División Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

H. Jurado

Presidente: Dr. Roberto Olayo González.

Secretario: Dr. Humberto Vázquez Torres. División Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Vocal: Dr. Miquel Gimeno Seco.

Vocal: Dr. José René Rangel Méndez. División de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 POLÍMEROS NATURALES	3
2.1.1 CELULOSA	4
2.1.2 QUITOSANO.....	6
2.1.2.1 Caracterización del quitosano.	8
2.1.2.2 Propiedad antimicrobiana del quitosano.....	9
2.1.2.3 Aplicaciones del quitosano.	10
2.1.3 QUITOOLIGOSACÁRIDOS.	11
2.2 Textiles funcionales o cosméticos.	13
2.2.1. Microcápsulas.	14
2.2.1.1. Proceso y técnica de microencapsulación.....	15
3. ANTECEDENTES	16
4. JUSTIFICACIÓN.....	19
5. OBJETIVOS.....	20
6. HIPÓTESIS	21
7. CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO Y QUITOOLIGOSACÁRIDOS.	22
7.1. Materiales y Métodos	22
7.1.1 Caracterización del quitosano.....	22
7.1.2 Caracterización de los quitooligosacáridos.....	23

7.2 Resultados y Discusión.	23
7.2.1 Caracterización del quitosano.....	23
7.2.2 Caracterización de los quitoooligosacáridos.....	24
8. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUITOOLIGOSACÁRIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS. ...	32
8.1 Materiales y Métodos	32
8.1.1 Microorganismos y Reactivos.	32
8.1.2 Determinación del crecimiento de los cultivos bacterianos.	32
8.1.3 Determinación de la tasa específica de crecimiento bacteriano.....	32
8.2 Resultados y Discusión	33
8.2.1 Determinación del crecimiento bacteriano.....	33
8.3 Conclusiones	37
9. FUNCIONALIZACIÓN DE TEXTIL DE CELULOSA CON QUITOSANO Y QUITOOLIGOSACÁRIDOS Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.	38
9.1 Materiales y Métodos	38
9.1.1 Reactivos.....	38
9.1.2 Microorganismos.....	38
9.1.2.1 Medios de cultivo	39
9.1.3 Tratamiento para la funcionalización del textil de celulosa con quitosano y con los quitoooligosacáridos.	39
9.1.4 Determinación de crecimiento de biomasa y tasa de germinación por efecto del textil funcionalizado.	43
9.2 Resultados y discusión	45
9.2.1 Preparación y caracterización de los textiles funcionalizados.....	45
9.2.2 Determinación de crecimiento de biomasa y tasa de germinación por efecto del textil funcionalizado.	53
9.3. Conclusiones	57
10. FUNCIONALIZACIÓN DE TEXTIL DE CELULOSA CON MICROCÁPSULAS DE QUITOSANO CON ACEITE ESENCIAL DE TORONJA.....	58
10.1. Materiales y Métodos	58
10.1.1 Reactivos.....	58
10.1.2 Microorganismos.....	58
10.1.3 Preparación de microcápsulas de quitosano.....	58
10.1.4 Entrecruzamiento de las microcápsulas de quitosano en textil de celulosa.....	59
10.1.5 Determinación de los compuestos volátiles del AET en las muestras funcionalizadas.	59
10.1.6 Determinación del contenido de quitosano en los textiles funcionalizados.	60
10.1.7 Morfología de las microcápsulas y de los textiles funcionalizados.....	60
10.1.8 Determinación de la inhibición de microorganismos indeseables con los textiles funcionalizados.	61

10.1.9 Análisis estadístico del tamaño de las microcápsulas.....	61
10.2. Resultados y Discusión	62
10.2.1 Preparación de las microcápsulas	62
10.2.2 Entrecruzamiento de las microcápsulas de quitosano en el textil de celulosa.....	67
10.2.3 Determinación de la inhibición bacteriana con los textiles de celulosa funcionalizada.....	71
10.3 Conclusiones	75
11. CONCLUSIONES GENERALES	76
PERSPECTIVAS.....	77
12. PUBLICACIONES.....	78
13. REFERENCIAS.....	78
ANEXOS	85
ANEXO 1	86
1. Técnicas para la caracterización de quitosano y quitooligosacáridos	86
ANEXO 2	91
2.1 Técnica para la determinación del crecimiento de cultivos bacterias con COS en microplacas.....	91
2.2 Análisis de varianza de los datos experimentales obtenidos con lotes de quitooligosacárido comerciales y tres diferentes cepas de bacterias.....	92
2.3 Técnica para calcular la tasa específica de crecimiento de <i>Lactobacillus plantarum</i> en microplacas.....	96
ANEXO 3	97
3. Técnicas para la caracterización de los materiales funcionalizados	97
3.a. Curva de calibración de quitosano usada para la determinación colorimétrica del nitrógeno con ninhidrina.....	98
ANEXO 4.....	101
4.a. Porcentaje de inhibición de <i>Escherichia coli</i> con aceite esencial de toronja a varias concentraciones.....	101
4.b. Porcentaje de inhibición de <i>Staphylococcus epidermidis</i> con puro aceite esencial de toronja a varias concentraciones.....	102

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Estructura molecular del monómero y polímero de celulosa.	4
Figura 2.	Estructura molecular de: a) éter de celulosa, b) éster de celulosa.	5
Figura 3.	Estructura molecular de quitina.	6
Figura 4.	Estructura molecular del polímero de quitosano.	7
Figura 5.	Estructura química: a) D-glucosamina, b) N-acetilglucosamina.	12
Figura 6.	Cromatograma de las fracciones de oligosacáridos obtenidos por permeación en gel de: a) lote de quitooligosacáridos C1, b) lote de quitooligosacáridos C2.	25
Figura 7.	Espectro MALDI-Tof de los quitooligosacáridos del lote C1	28
Figura 8.	Espectro MALDI-Tof de los quitooligosacáridos del lote C2	31
Figura 9.	Densidad óptica en relación al crecimiento de tres diferentes cepas usadas con COS a diferentes concentraciones: a) lote C1 de quitooligosacáridos, b) lote C2 de quitooligosacáridos.	35
Figura 10.	Esquema del mecanismo de reacción de esterificación en presencia de fosfato de sodio, ácido cítrico, quitosano y celulosa.	46
Figura 11.	Micrografías electrónicas de barrido de textiles de celulosa funcionalizados con quitosano.	48
Figura 12.	Espectros de FTIR de cada una de las etapas del proceso para la funcionalización del textil de celulosa previamente irradiada con luz UV, con quitosano.	50
Figura 13.	Termogramas del textil de celulosa funcionalizado con quitosano y su comparación con celulosa y quitosano.	51
Figura 14.	Fotografías de la medición del ángulo de contacto con los textiles funcionalizados con quitosano.	52
Figura 15.	Tasas específicas de crecimiento (μ_{max}) y máxima biomasa (X_{max}) de <i>Penicillium chrysogenum</i> determinada con textil de celulosa crudo, textil de gasa comercial y textiles funcionalizados con quitosano.	53

Figura 16.	Porcentaje de germinación de esporas de <i>P. chrysogenum</i> determinado para: celulosa cruda quitosano en 4p/v% de AC y NaH ₂ PO ₄ ; quitosano en 4p/v% de AC y NaH ₂ PO ₄ y 8h UV; textil comercial con propiedades antimicrobianas (gasa).	54
Figura 17.	Tasa específica de germinación, <i>k</i> , y máximo porcentaje de esporas germinadas, <i>S</i> _{max} , de <i>P. chrysogenum</i> determinada con textil de celulosa crudo, textil comercial (gasa) y varias muestras funcionalizadas con quitosano.	55
Figura 18.	Porcentaje de inhibición de <i>E. coli</i> determinado para: celulosa cruda quitosano en 4p/v% de AC y NaH ₂ PO ₄ ; quitosano en 4p/v% de AC y NaH ₂ PO ₄ y 8h UV; textil comercial con propiedades antimicrobianas (gasa).	56
Figura 19.	Micrografías por SEM de microcápsulas: a) Emulsión A, b) Emulsión B, c) Emulsión C.	62
Figura 20.	Histogramas de la distribución del tamaño de partícula del secado por aspersion de: a) emulsión B; b) emulsión C.	64
Figura 21.	a) Cromatograma de los compuestos volátiles obtenidos del espacio de cabeza de AET, b) Espectros de las masas de cada uno de los picos obtenidos por GC del AET, correspondientes a: 3-Butil-1-ol, D-Limoneno, α-pineno, β-pineno y Limoneno.	66
Figura 22.	Concentración de los compuestos volátiles obtenidos en el espacio de cabeza y caracterizados por GC-MS, del AET, de las muestras obtenidas del secado por aspersion de cada una de las emulsiones (SA), así como del espacio de cabeza de las emulsiones.	67
Figura 23.	Micrografías por SEM de: a) celulosa funcionalizada M1, b) celulosa funcionalizada M3.	68
Figura 24.	Estructura idealizada de Hidroxi-propil-metil celulosa, HPMC.	69
Figura 25.	Histogramas de la distribución del tamaño de las microcápsulas entrecruzadas al textil de celulosa: a) Muestra M1; b) Muestra M3.	70
Figura 26.	Compuestos del aceite esencial de toronja determinado por GC-MS en los textiles funcionalizados. AET: Aceite esencial de toronja. M1a y M3a: textiles funcionalizados al tiempo 0, M1b y M3b: textiles funcionalizados almacenados durante 6 meses.	71
Figura 27.	Porcentaje de inhibición de: a) <i>E. coli</i> , b) <i>S. epidermidis</i> , ambos con los textiles funcionalizados, M1 y M3.	73
Figura 28.	Micrografías por SEM: a) y b) textil funcional, muestra M1 después de 54h de incubación a 37°C en medio nutritivo con <i>E. coli</i> .	74

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Derivados de celulosa.	5
Tabla 2.	Técnicas para la obtención de microcápsulas.	15
Tabla 3.	Caracterización de quitosanos comerciales (marca Heppe GmbH).	24
Tabla 4.	Descripción de los quitoooligosacáridos del lote C1	27
Tabla 5.	Descripción de los quitoooligosacáridos del lote C2	30
Tabla 6.	Tasa específica de crecimiento (μ) para <i>Lactobacillus plantarum</i> obtenidas en presencia de quitoooligosacáridos.	37
Tabla 7.	Composición de los tratamientos para la funcionalización de textiles de celulosa con quitosano.	41
Tabla 8.	Composición de los tratamientos para la funcionalización de textiles de celulosa con quitoooligosacáridos.	41
Tabla 9.	Contenido de quitosano en textiles de celulosa funcionalizada.	47
Tabla 10.	Determinación del ángulo de contacto de las muestras funcionalizadas.	52
Tabla 11.	Tasas específicas de crecimiento obtenidas para <i>E.coli</i> con las muestras funcionalizadas con mayor contenido de quitosano.	57
Tabla 12.	Contenido de quitosano presente en el textil funcionalizado.	68
Tabla 13.	Tasas específicas de crecimiento (μ) para <i>E.coli</i> y para <i>S.epidermidis</i> con los textiles funcionalizados estimadas con un modelo exponencial.	72

ABREVIATURAS

AA	Acido Acético
AC	Acido Cítrico
AET	Aceite Esencial de Toronja
au	Unidades Arbitrarias
CHN	Análisis elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno.
COS	Quitooligosacáridos (“Chitooligosacarides”).
F _A	Fracción acetilada
G	Glucosamina
GA	Grado de acetilación
GC-MS	Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas
HPMC	Hidroxi-propil-metil celulosa
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier.
<i>k</i>	Tasa específica de germinación de esporas.
kDa	kiloDalton
MD	Maltodextrina
M _w	Peso molecular promedio ponderal por sus siglas en inglés “molecular average weight”.
MRS	Medio de cultivo para bacterias lácticas desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe.
NAG	N-acetilglucosamina
PDA	Medio de cultivo de Agar Papa Dextrosa
S _{max}	Máximo porcentaje de esporas germinadas
ufc/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro
μ _{máx}	Tasa máxima específica de crecimiento
X _{máx}	Máxima producción de biomasa
η	Viscosidad intrínseca
η _{red}	Viscosidad reducida

RESUMEN

Se caracterizaron quitosanos y quitoooligosacáridos comerciales; se evaluó el efecto de estos últimos sobre el crecimiento de bacterias. Los resultados mostraron que los quitoooligosacáridos fueron inhibitorios para *Escherichia coli*, gram negativa. Pero también se observó que éstos favorecieron el crecimiento de las bacterias gram positivas *Lactobacillus plantarum* y *Bacillus subtilis*.

Se realizaron tratamientos para la funcionalización de textiles de celulosa por medio del entrecruzamiento químico no tóxico con el quitosano previamente caracterizado; con la finalidad de brindarle propiedades antimicrobianas a la celulosa. Para este fin se llevó a cabo una reacción de esterificación mediante un tratamiento térmico en donde se usó ácido cítrico como agente entrecruzante y fosfato de sodio como catalizador. Se confirmó la presencia de enlaces éster entre el quitosano y la celulosa, pudiendo comprobar con esto la fijación del quitosano en la celulosa. Con la finalidad de incrementar la cantidad de quitosano incorporado a la celulosa esta fue previamente irradiada con luz ultravioleta, probando diferentes tiempos de exposición. Con este pretratamiento se obtuvo una mayor cantidad de quitosano entrecruzado.

Una vez establecidas las condiciones para la mejor funcionalización del textil de celulosa entrecruzada con el quitosano, como tiempo de irradiación ultravioleta, temperatura y concentraciones de agente entrecruzante y de catalizador. Se realizó el entrecruzamiento de celulosa con quitoooligosacáridos y con microcápsulas de quitosano con aceite esencial de toronja sobre los textiles.

Las propiedades antimicrobianas de éstos materiales obtenidos fueron evaluados contra gasa comercial la cual contiene sales cuaternarias de amonio como agente antimicrobiano. Las muestras con mayor contenido de quitosano mostraron mayor inhibición de *E.coli* y *Penicillium chrysogenum* durante las primeras 12 h de contacto, que el producto comercial. Los materiales de celulosa tratados con quitoooligosacáridos no fueron inhibidores para las cepas evaluadas. Las muestras de textil tratado con las microcápsulas tuvieron 100% de inhibición de *E. coli* y *Staphylococcus epidermidis* hasta por 54h, inhibición microbiana similar a la obtenida con la gasa comercial.

ABSTRACT

In this work, chitosan cross-linked cellulose fibers were prepared using non-toxic and eco-friendly procedures in order to confer antimicrobial properties to cellulose fibers.

Initially, commercial chitosans and chitooligosaccharides were physico-chemically characterized and the latter were tested by assays *in vitro*. Chitosan was selected based on molecular weight and acetylation degree. Chitooligosaccharides were inhibitory to the gram negative bacteria *E. coli*, although favored the growth of gram positive bacteria, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis*.

Secondly, the conditions for crosslinking chitosan with cellulose were established by an esterification reaction with citric acid as crosslinking agent and sodium phosphate as catalyst during heat treatment. Pretreatment of cellulose with UV-irradiation resulted in higher chitosan incorporation to cellulose textiles. The presence of carbonyl bonds was confirmed, showing the chemical fixation of chitosan into cellulose. Once the treatments for the best functionalization of the cellulose textile were established, chitooligosaccharides and chitosan microcapsules were crosslinked to it.

And further, the materials obtained were compared with a commercial textile of cellulose with antimicrobial capacity by the presence of quaternary ammonium salts. The biomass content, spore germination and inhibition percentages of *Penicillium chrysogenum* and *Escherichia coli* in the presence of the synthesized materials were determined with high antimicrobial efficiencies; whereas the textiles with COS were not inhibitory to the tested microorganisms. The materials with chitosan microcapsules produced almost 100% of inhibition of *E. coli* and *Staphylococcus epidermidis*.

1. INTRODUCCIÓN

La actual tendencia en la industria textil es agregar propiedades a las inherentes en los textiles. Esta tendencia da origen a los “textiles funcionales” o “textiles cosméticos” (Shi *et al*, 2007), en los cuales se mejoran la textura, resistencia, porosidad del textil, permeabilidad y capacidades que evitan el encogimiento mediante la adición de compuestos e inclusive brindándole propiedades desodorantes agregándole así un valor adicional. Por ello, en Europa y Asia, la industria textil ha evolucionando en esta dirección y, durante los últimos 10 años, diferentes productos han salido al mercado mostrando algunas de las propiedades antes mencionadas además de algunas antimicrobianas (Chung, 1998).

Un textil funcional se hace por la aplicación de un producto ya sea sintético o de origen natural directamente al textil. Entre más funciones se deseen mayor es el número de sustancias que se pueden requerir, lo cual puede involucrar riesgos en la salud y el medio ambiente, es por esto que las compañías están siendo presionadas por las autoridades y por algunos grupos preocupados por el medio ambiente para que se demuestre la ausencia de efectos indeseables en el producto final y durante su proceso (Breit, 2003). De ahí la demanda de productos naturales, no tóxicos, biocompatibles y biodegradables que replacen los sintéticos.

En ese sentido, la quitina y su derivado, el quitosano, biodegradables y biocompatibles a diferencia de los polímeros sintéticos; están siendo usados en varias industrias como la farmacéutica, cosméticos, papelera, alimentos, para el tratamiento de agua, entre otras, debido a sus propiedades físicas y químicas así como por las propiedades antimicrobianas que han presentado (Agulló *et al*, 2003). Por lo tanto estos biopolímeros pueden ser de gran importancia en aplicaciones en donde se desee controlar o evitar la contaminación por microorganismos, sustituyendo a algunos agentes antimicrobianos hasta ahora usados.

En la actualidad en México no hay ningún desarrollo en esta área, pues no se han encontrado ni patentes mexicanas registradas ni bibliografía de autores mexicanos al respecto (IMPI, 2008; ISI Web of Science, 2009). Por esto y por lo antes descrito, el

objetivo de este trabajo de investigación fue el uso de reactivos no tóxicos, materias primas biodegradables como el textil de celulosa y quitosano para la obtención de productos textiles con propiedades antimicrobianas así como con un agradable aroma, con diversas aplicaciones potenciales.

Este trabajo consta de una revisión bibliográfica en donde se describe a la celulosa y al quitosano, así como las propiedades químicas y físicas de cada uno. Seguido de la descripción del concepto de textiles funcionales. Se mencionan también los antecedentes de reportes científicos en los que buscan funcionalizar textiles, los cuales tienen como común denominador el uso de algún reactivo tóxico. Dando con esto pie para la presentación de la justificación seguida de los objetivos y la hipótesis de éste trabajo.

En la sección correspondiente a los resultados se describen en capítulos, cada uno con la descripción de la metodología y materiales usados, para la obtención de dichos resultados con los que se logró la efectiva funcionalización del tejido de celulosa, así como las correspondientes conclusiones de cada uno de éstos capítulos.

Por último se describen las conclusiones generales obtenidas con este trabajo así como las perspectivas a las que dio lugar.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El término polímero, proviene de las palabras griegas *Poly* y *Mers*, que significa muchas partes; son macromoléculas formadas por la unión de unidades de repetición (monómeros) de moléculas idénticas o diferentes entre sí (Weimer y Haigler, 1991).

Los polímeros pueden ser de tres tipos:

Polímeros naturales: provenientes directamente del reino vegetal o animal. Por ejemplo: celulosa, quitina, almidón, proteínas, caucho natural, ácidos nucleicos, etc.

Polímeros artificiales: son el resultado de modificaciones mediante procesos químicos de ciertos polímeros naturales. Ejemplo: nitrocelulosa, etonita, etc.

Polímeros sintéticos: son los que se obtienen por procesos de polimerización controlados por el hombre a partir de materias primas de bajo peso molecular. Ejemplo: nylon, polietileno, cloruro de polivinilo, etc.

2.1 POLÍMEROS NATURALES

A lo largo de cientos de años se han utilizado polímeros naturales procedentes de plantas y animales. Los polímeros naturales tales como las proteínas, los almidones y la celulosa tienen importancia en los procesos bioquímicos y fisiológicos de plantas y animales. Entre estos polímeros naturales se encuentran los polisacáridos (azúcares) y los polipéptidos como la seda y queratina.

Desde el fin de la segunda guerra mundial, el campo de los materiales ha revolucionado por la llegada de los polímeros sintéticos. Las propiedades físicas y químicas de los polímeros dependen de la estructura elemental del material así como de las posibles mezclas y procesos tanto físicos como químicos e incluso biológicos, con la finalidad de obtener materiales de origen natural que cubran las necesidades actuales de la sociedad. Dentro de estos polímeros naturales, uno de los más usados ha sido la celulosa y desde hace aproximadamente una década, la quitina y su derivado el quitosano han tenido gran relevancia debido a sus múltiples aplicaciones (Lárez, 2006).

2.1.1 CELULOSA

La celulosa es uno de los muchos polímeros encontrados en la naturaleza, pero el primero en abundancia. La madera, el papel y el algodón están formados por fibras de celulosa. La principal fuente de celulosa es la madera la cual es procesada físico-químicamente para poder tener la fibra usada en los textiles o la pulpa para el papel o cartón.

La celulosa es un polímero natural, constituido por una larga cadena de carbohidratos, $(C_6H_{10}O_5)_n$, cuenta con un valor mínimo de n igual a 800 o 10,000 cuando esta en estado natural; mientras que una vez arreglada la fibra por el hombre, n llega a ser de entre 250 a 350 (Cook, 1984). Su estructura está formada por la unión de moléculas de β -glucosa a través de enlaces β -1,4-glucosídico, tiene una estructura lineal o fibrosa en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, haciéndolas muy resistentes e insolubles al agua. De esta manera, se originan fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales, dándoles así la necesaria rigidez junto con hemicelulosa, pectina, extensina (que actúan como aglutinante entre las fibras celulósicas) y lignina (Joseph, 1988).

La celulosa es altamente funcional debido a sus tres grupos hidroxilos presentes en cada unidad de anhidroglucosa, Figura 1 (Joseph, 1988; Cook, 1984).

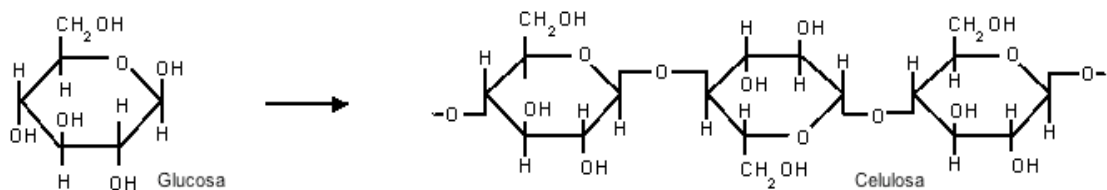


Fig. 1. Estructura molecular del monómero y polímero de celulosa.

La resonancia magnética nuclear (NMR) es la técnica más usada para la determinación de la estructura molecular de la celulosa, la espectroscopia infrarroja (FTIR) es la segunda más empleada y por último la menos usada es RAMAN. Mientras que para la determinación de la orientación y morfología de las cadenas es más usada la microscopía electrónica de barrido (SEM) (Klemm *et al*, 2005).

La mayor información que se obtiene sobre la cristalinidad, dimensiones del cristal, orientación y morfología es mediante difracción de rayos X, barrido de amplio rango de rayos X (por sus siglas en inglés, WAXS) y SAXS. También es posible usar técnicas de difracción de neutrón y de electrón para obtener la información antes mencionada, pero estas técnicas resultan mucho más caras, por lo que no son tan usadas.

Esta caracterización es también usada para los derivados de la celulosa, los cuales se obtienen por una reacción de sustitución sobre el grupo hidroxilo, teniendo como resultado un éster de celulosa o un éter de celulosa. Algunos ejemplos se muestran en la tabla 1. En la Figura 2 se presentan las estructuras moleculares de un éter de celulosa y de un éster de celulosa (Joseph, 1988).

Tabla 1. Derivados de celulosa*.

Éster de celulosa	Éter de celulosa	
	Iónica	No Iónica
Acetato de celulosa	Carboximetil celulosa	Metil celulosa
Nitrato de Celulosa	-	Hidroxipropil celulosa
Sulfato de Celulosa	-	Hidroxietil celulosa
-	-	Etil celulosa

*(Weimer, 1991)

La celulosa ocupa un lugar importante en la historia de los polímeros porque fue utilizada para hacer algunos de los primeros polímeros sintéticos, tales como el nitrato de celulosa, acetato de celulosa y el rayón.

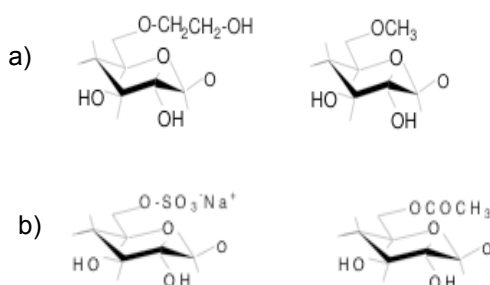


Fig. 2. a) éter de celulosa, **b)** éster de celulosa.

Otro miembro importante de los polisacáridos es la quitina, el biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa. La quitina se encuentra ampliamente distribuida en artrópodos, moluscos, anélidos, branquiópodos, hongos ascomicetos, basidiomicetos, ficomicetos e imperfectos, así como en algunas algas clorofíceas. Dentro de estos organismos la quitina tiene diversas funciones e integra estructuras y organelos tan variados como exoesqueletos, conchas, paredes celulares, cutículas, entre otras, en proporciones que representan desde trazas hasta el 80% de la estructura en cuestión (Muzarelli, 1977; Shirai *et al*, 1996a). La quitina es un homopolisacárido conformado por unidades de N-acetil-D-glucosamina, unidas por enlaces glucosídicos β -1,4, en el que se alternan los residuos N-acetil a lo largo de la cadena (Deshpande, 1986), Figura 3, de la misma forma que las unidades de glucosa componen la celulosa. Esto permite un incremento de los enlaces de hidrógeno con los polímeros adyacentes.

La quitina es usada como agente floculante para tratamiento de agua, como agente para curar heridas, como espesante y estabilizador en alimentos y medicamentos, como resina intercambiadora de iones (Agulló *et al*, 2003). Es altamente insoluble en agua y en algunos disolventes orgánicos debido a los enlaces de hidrógeno que presenta la molécula. Se vuelve más soluble en ácidos inorgánicos diluidos cuando pierde el acetilo del grupo acetilamino, convirtiéndose en su derivado el quitosano (Muzzarelli, 1985).

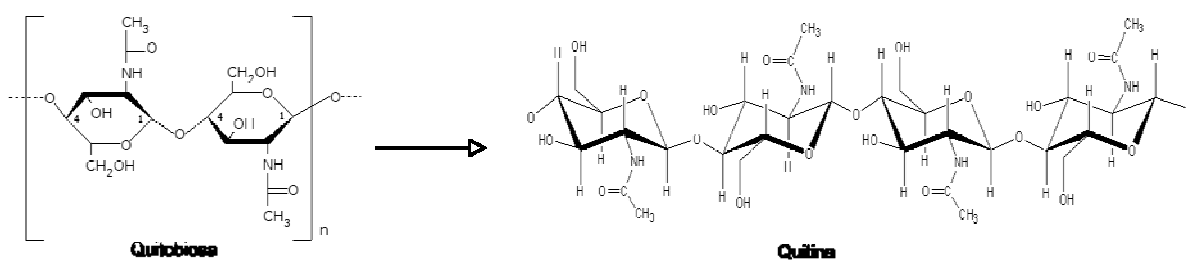


Fig. 3. Estructura de quitina.

2.1.2 QUITOSANO

Es un biopolímero derivado de la quitina formado por monómeros de 2-amino-2-desoxi- β -D-glucosa con uniones β -1,4 (Figura 4), el cual se obtiene de forma industrial

mediante una reacción de desacetilación sobre la quitina, en donde se elimina al menos un 50% de los grupos acetilo presentes (Lárez, 2006). Derivado muy importante por ser biodegradable y no tóxico.

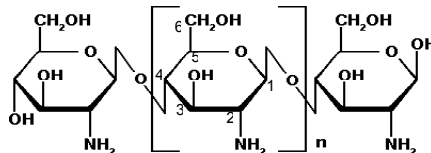


Fig. 4. Estructura molecular del polímero de quitosano.

El quitosano se ha encontrado de forma natural en las paredes celulares de hongos como en *Mucor rouxii* llegando a representar hasta un tercio de su peso (Lárez, 2006). Sin embargo, la fuente más importante del quitosano a nivel industrial es la quitina, la cual es obtenida de desechos de crustáceos como el camarón, el krill y el calamar; la producción mundial de quitina al año se estima que es de alrededor de 1,560 millones de toneladas (Agulló, 2003), valor creciente en los últimos años.

Este biopolímero, al igual que la quitina, son de alto interés comercial debido a su elevado contenido de nitrógeno (~6.89%), así como a sus propiedades fisicoquímicas tales como viscosidad, solubilidad y biomodificación, las cuales varían de acuerdo a su peso molecular (M_w), grado de acetilación (GA), grado de polimerización (GP) así como disolvente usado y condiciones temperatura y pH a las que se encuentre.

En general el quitosano tiene tres tipos de grupos funcionales reactivos, el grupo amino, dos grupos hidroxilo secundarios localizados en los carbonos 4 y 3, y el grupo hidroxilo primario del carbono 6, Figura 4, (Shahidi *et al*, 1999); y según las modificaciones químicas que sufra por medio de procesos, tanto químicos como enzimáticos, sus propiedades tales como reactividad, solubilidad, entre otras, pueden cambiar.

Se ha demostrado que este biopolímero posee actividad antimicrobiana contra microorganismos tales como hongos y bacterias (Plascencia *et al*, 2003), y ésta es influenciada por factores intrínsecos como el tipo de quitosano, GP y GA, célula huésped,

presencia de nutrientes, composición química de los sustratos y condiciones del medio ambiente. Pero la concentración mínima inhibitoria requerida de quitosano varía según el microorganismo, siendo también dependiente del pH del medio, GP del biopolímero así como de la presencia o no de sustancias tales como lípidos y proteínas que pueden interferir (Agulló *et al*, 2003).

Esta propiedad antimicrobiana que tiene el quitosano lo hace un producto de gran interés y alternativo al uso de sustancias químicas tóxicas que evitan la contaminación por microorganismo como hongos tanto en alimentos, animales y el ser humano, así como en lugares propensos a la propagación de los microorganismos en alimentos e incluso en sistemas de ventilación y aire acondicionado (Chang *et al*, 1996).

2.1.2.1 Caracterización del quitosano.

El quitosano puede ser caracterizado en términos de su calidad, propiedades intrínsecas (pureza, masa o M_w , viscosidad y GA) y formas físicas. Además, la calidad y propiedades de un lote de quitosano pueden variar significativamente debido a diversos factores involucrados en su proceso de obtención y materia prima que pueden afectar el producto final. Actualmente el quitosano es comercializado por un gran número de productores y en diferentes grados de pureza, M_w y GA. Es ampliamente conocida la importancia del GA como uno de los parámetros químicos a evaluar en materiales quitinosos, pues determina el tipo aplicaciones (Li *et al*, 1997).

Para la determinación del GA se han publicado métodos muy variados que comprenden desde pruebas colorimétricas con ninhidrina, titulación potenciométrica, titulaciones con bromuro de hidrógeno, hasta técnicas espectroscópicas como las de infrarrojo cercano, de resonancia magnética nuclear (HNMR), espectroscopia infrarroja y ultravioleta visible (Muzzarelli, 1985 y 1998). Algunos de estos métodos suelen ser bastante laboriosos y costosos (como el de HNMR) o inclusive destructivos (como la prueba con ninhidrina). Normalmente el % de acetilación (%GA) del quitosano comercial puede oscilar entre el 25 y el 20%. El quitosano de mayor calidad tiene un GA menor al 15% (Agulló *et al*, 2003).

El peso molecular (M_w) es una de las características intrínsecas del quitosano y se determina por cromatografía y viscosimetría. La viscosidad de una solución de quitosano se ve influenciada por diversos factores como el GA, M_w , concentración de la solución, fuerza iónica, pH, temperatura y tipo de ácido usado como disolvente. Por lo general, un aumento en la temperatura implica una disminución de la viscosidad de la solución.

La solubilidad es también un parámetro importante del quitosano; es insoluble en agua, álcalis o disolventes orgánicos, aunque es soluble en la mayoría de las soluciones de ácidos orgánicos cuando el pH es < 6 (Agulló *et al*, 2003).

La humedad y el contenido de cenizas en el quitosano se determinan por métodos gravimétricos; ambos son parámetros de calidad del quitosano, al igual que el color, olor y apariencia, los cuales se determinan organolépticamente. El contenido de grasas se determina con un método estándar como el ASTM D 1107-86 o por extracción con acetona. El contenido de nitrógeno se determina generalmente por el método de Kjeldahl o por análisis elemental (CHN). No es de menos importancia el contenido de coliformes, debido a su origen animal además de ser indicativo de la calidad del proceso de extracción, transporte y manejo (Agulló *et al*, 2003).

2.1.2.2 Propiedad antimicrobiana del quitosano.

El quitosano presenta actividad antimicrobiana debido a la carga positiva presente en el carbono 2 del monómero de glucosamina (fig. 5), el cual se forma a pH ácido; ésta propiedad, como todas las del quitosano, varía con a su peso molecular, grado de acetilación, concentración y pH del medio en el que se encuentre. El mecanismo exacto de la acción microbiana del quitosano aún no está totalmente definido, pero puede deberse a:

- a) Interacción entre las cargas positivas (+) presentes en el quitosano en medio ácido y las cargas negativas (-) presentes en la membrana celular del microorganismo. Este intercambio puede provocar la degradación de proteínas y otros constituyentes intracelulares, o alterar la permeabilidad de la pared celular, causando así la muerte del microorganismo por la falta de materiales esenciales (Chan *et al*, 2001).

- b) Activación de mecanismos de defensa en células huésped, los cuales se relacionan con la reducción de aflatoxinas, inducción de fitoalexinas y otros compuestos fenólicos, así como el incremento en la producción de enzimas tales como quitinasas, quitosanasas y glucanasas o fenilalanina amino-liasas (Vander *et al*, 1998).
- c) Penetración del quitosano a través de la célula microbiana e interacción entre él y el DNA, inhibiendo la síntesis de RNA mensajero, la síntesis de proteínas y de enzimas (Fang, 2001).

2.1.2.3 Aplicaciones del quitosano.

Debido a la versatilidad de este biopolímero, se conoce una amplia gama de aplicaciones en distintas áreas donde se ha empleado con gran eficacia y altos rendimientos. Entre las aplicaciones más relevantes destacan campos como:

- **Biomedicina y Farmacia:** Sus mayores usos han sido en la elaboración de membranas de hemodiálisis, suturas biodegradables, sustitutos artificiales de la piel, agentes cicatrizantes en quemaduras, sistemas liberadores de fármacos como para la liberación de insulina, transporte de agentes para el tratamiento contra cáncer y para la detención de hemorragias (Bernkop-Schnürch, 2000; Sato *et al*, 2001; Takeuchi *et al*, 2003 y 2005; Biruss *et al*, 2006).
- **Agricultura y Ganadería:** en estas áreas se ha empleado para el recubrimiento de semillas con el fin de conservarlas con buena calidad durante el almacenamiento; para la producción de sistemas liberadores de fertilizantes, como complemento alimenticio para animales; en la formulación de pesticidas; como recubrimiento para frutos para alargar su vida de anaquel y evitar su contaminación por hongos, entre otros (Liu *et al*, 2004; Ribeiro, 2007).
- **Tratamiento de aguas:** es una de las áreas más importantes debido a que el quitosano es una sustancia “ambientalmente amigable” y se ha usado como floculante para la remoción de partículas coloidales sólidas y aceites de pescado, así como coagulante primario para aguas residuales de alta turbidez y alta alcalinidad (Li *et al*, 1997).
- **Alimentos:** en la industria alimenticia se ha usado como soporte para la inmovilización de enzimas en la producción de maltosa, como espesante en la producción de

alimentos, como agente de oxidación controlada y como conservador (Shahidi *et al*, 1999).

- Química analítica: en esta área destacan sus aplicaciones cromatográficas, en intercambiadores de iones, en la absorción de metales pesados y adsorción de ácidos, en la fabricación de electrodos específicos para metales, entre otros (Bernkop-Schnüch, 2000).
- Agente dietético: ha sido ampliamente empleado en la fabricación de productos adelgazantes, en donde actúa como agente de remoción de grasas presentes en el estómago (Pitler, 1999).
- Cosméticos: en esta área se ha utilizado en la fabricación de espumas de afeitar y jabones como aditivo bactericida, cremas para la piel y el cuerpo como agente hidratante, pues sus geles pueden suministrar agua y evitar la resequedad (Lárez, 2006).
- Papel y Textil: el quitosano en la manufactura del papel incluye el tratamiento de la superficie con una solución de quitosano al 1%, con el fin de incrementar su dureza y resistencia al doblamiento sin disminuir el brillo del papel; empleando soluciones al 0.5% de quitosano mejora el color de la fibra (Li *et al*, 1997). En la industria textil el quitosano se ha empleado para lograr mejor fijación de los colorantes sobre textiles de origen natural (Rattanaphani *et al*, 2007).

2.1.3 Quitoooligosacáridos.

Un oligosacárido es un sacárido que contiene un número pequeño de unidades monoméricas de azúcar (entre 3 y 10). El nombre deriva del griego *oligos*, que significa unos “pocos” o “insuficientes” (MeSH, 2009).

Los quitoooligosacáridos son oligosacáridos de quitosano que pueden ser homo o heterooligómeros, ya sea compuesto por unidades de N-acetil-glucosamina y/o de D-glucosamina, Figura 5, unidos al igual que el quitosano por enlaces β -1,4.

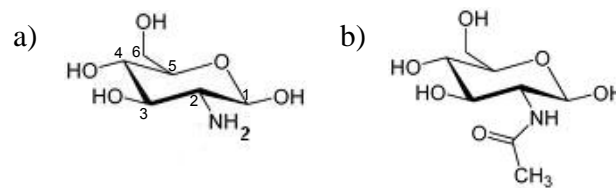


Fig. 5. Estructura química de: **a)** D-glucosamina, **b)** N-acetilglucosamina.

La N-acetilglucosamina (NAG) es químicamente un derivado amino azúcar; es la unidad básica de muchos oligosacáridos, glicoproteínas y glicolípidos de importancia biológica; la aplicabilidad de éste monómero junto con la glucosamina (G) es de gran relevancia en el área biomédica (Lopatin *et al*, 1995).

Los quitooligosacáridos (COS) son compuestos con muy baja viscosidad en disolución debido a su bajo peso molecular, son solubles en soluciones acuosas neutras y parecen ser rápidamente absorbidos *in vivo* (Jeon y Kim, 2000). De acuerdo con estas características fisiológicas reportadas, los carbohidratos se pueden clasificar como digestibles o no digestibles. El concepto de oligosacárido no digestible se origina de la observación de que el átomo de carbono anomérico (carbono 1 o carbono 2) de las unidades del monosacárido de algunos oligosacáridos dietéticos tiene una configuración que hace que sus enlaces osídicos no sean digestibles a la actividad hidrolítica de enzimas humanas (Roberfroid y Slavin, 2000).

La importancia de estos derivados de quitosano, se debe a sus posibles aplicaciones, ya que se ha observado que poseen algunas actividades biológicas: como antitumoral, favorecen la desaparición de metástasis, efecto inmunoestimulador a través de la activación de macrófagos e inducción quimotáctica de células polimorfonucleares, además de presentar actividad antifúngica y antimicrobiana (Bahrke *et al*, 2000; Lopatin *et al*, 1995), así como por su efecto como prebiótico (Lee, 2002). En cuanto a esta última propiedad se ha reportado que los COS adicionados en alimentos como un ingrediente prebiótico, el cual se define como aquel no digestible que beneficia al anfitrión selectivamente estimulando el crecimiento o la actividad de un número limitado de residentes bacterianos ya existentes en el colón

(Gibson y Roberfroid, 1995), tienen un impacto benéfico en las funciones gastrointestinales y, por lo tanto, en la salud y bienestar del ser humano.

2.2 Textiles funcionales o cosméticos.

Los textiles funcionales o inteligentes son materiales que reaccionan ante estímulos externos a partir de propiedades extras a las ya inherentes del material. Estos textiles son posibles por la aplicación de tecnologías de la información, la biotecnología, la nanotecnología y la microelectrónica en su proceso de fabricación. En el campo de la indumentaria pueden conservar el calor en ambientes fríos o ser frescos en ambientes más cálidos proporcionando así comodidad que incluso puede ser adaptada a la moda de forma personalizada mediante efectos especiales de colorido (Shi y Xin, 2007).

Esta línea de investigación sobre el estudio de los textiles funcionales, los cuales son definidos como aquellos que no sólo desempeñan las tareas propias de los artículos textiles convencionales, sino que, además ejercen otros cometidos no inherentes a su naturaleza, es de gran importancia e innovación.

La aplicación de los productos microencapsulados en el sector textil es alta, pudiéndose obtener textiles ampliamente funcionalizados, con características hasta ahora impensables en éstos, características derivadas de la naturaleza de los agentes contenidos en el núcleo de las microcápsulas, las cuales pueden contener entre otros (AITEK, 2003):

- Perfumes
- Productos terapéuticos y cosméticos (productos hidratantes, ambientadores, tonificantes).
- Bactericidas, repelentes antimosquitos, acaricidas.
- Combinación de ingredientes (perfume y bactericida).
- Pigmentos cuyo color cambia con la temperatura (foto y termocromismo).
- Agentes con resistencia al fuego.
- Agentes para la protección a las radiaciones UV.
- Materiales de cambio de fase para la adaptación al clima.

En algunas aplicaciones se precisa la liberación progresiva y controlada de los agentes microencapsulados, para conseguir la emisión de olores o fármacos, lo cual se logra porque la naturaleza del polímero recubriente lo permite. Los materiales de cambio de fase, con un buen desarrollo textil son capaces de almacenar en la microcápsula el calor emanado por el cuerpo y liberarlo en función de la temperatura exterior y gracias a sus posibilidades de cambio de fase de sólido a líquido y viceversa; concretamente, cuando cambian de sólido a líquido absorben calor, el cual liberan por su paso de líquido a sólido (Salgado, 2009). Las enormes posibilidades que surgen por la aplicación de microcápsulas en el ámbito textil han propiciado la aparición del término “textiles inteligentes” o “textiles funcionales”. Mediante esta técnica se pueden lograr características de vanguardia de todo tipo: funciones terapéuticas, cosméticas, liberación de perfumes, protección y muchas otras, siempre dependiendo del agente encapsulado y sin la aparición de cambios externos sin embargo, es indispensable tener en consideración la normatividad acerca de la emisión de sustancias tóxicas pues los textiles así tratados estarán en contacto directo con la piel (Shi y Xin, 2007).

2.2.1. Microcápsulas.

La microcápsula está compuesta por dos elementos claramente diferenciados; el núcleo, por lo general un compuesto activo, y un delgado armazón polimérico que envuelve al primero. El proceso de obtención es un procedimiento complejo por el cual ciertas sustancias activas (aromas, bactericidas, etc.) son introducidas en la matriz o sistema pared de naturaleza polimérica y se logra, una liberación gradual de los agentes activos, si se precisa, en función de los requerimientos concretos de la futura aplicación del sustrato en el que se depositen las microcápsulas (Salgado, 2009).

El núcleo puede estar compuesto por sustancias líquidas o sólidas. En el primer caso se trata de una pequeña gota que contiene un agente activo de naturaleza soluble. Si por el contrario, el agente es insoluble, el núcleo está compuesto por una suspensión, ya sea por emulsión o por dispersión del mismo en el líquido portador. Esta suspensión puede modificarse o formularse en función del uso al que vaya a ser destinada (Salgado, 2009). En cuanto al recubrimiento del núcleo, el polímero utilizado para la construcción de su coraza puede ser tanto de origen natural como sintético. Para la formación de las microcápsulas existen diferentes técnicas tanto físicas como químicas, pero siempre el resultado final es

una suspensión de microcápsulas con un tamaño que oscila entre uno y varios cientos de micrómetros (Salgado, 2009).

2.2.1.1. Proceso y técnica de microencapsulación.

Este proceso depende de varios factores y, a pesar de existir diversos métodos, el principio básicamente se fundamenta en la deposición por etapas del material de recubrimiento sobre el agente que se requiere encapsular. En una primera fase el material de recubrimiento se presenta en estado líquido por efecto de haber sido sometido a una fusión o disolución en un disolvente. Por otra parte, la sustancia por encapsular, en forma de pequeñas partículas (en el caso de agentes activos en estado sólido) o gotas (en caso de líquidos), en el medio apropiado, que puede estar en fase líquida o gaseosa, atendiendo a las propiedades del agente a encapsular. En una fase posterior, y por diversas técnicas, el recubriente se deposita sobre la sustancia a encapsular y finalmente se produce la solidificación del material de recubrimiento (AITEK, 2003).

Existe una amplia variedad de métodos para microencapsular y basándose en el principio antes descrito, son muy diferentes entre ellos. En general estos métodos pueden ser agrupados en tres grupos, atendiendo a su naturaleza. A continuación se enuncian las técnicas más representativas de cada uno (Tabla 2):

Tabla 2. Técnicas para la obtención de microencapsulados.*

Procesos Físicos	Procesos Químicos	Procesos Físico-Químicos
Secado por aspersión	Coacervación simple	Polimerización interfacial
Extrusión	Coacervación compleja	Inclusión molecular
Recubrimiento por aspersión	Atrapamiento de liposomas	

(AITEK, 2003)*

3. ANTECEDENTES

El inicio de la producción de las fibras sintéticas data del año 1857 aproximadamente; la mayoría de las técnicas para su producción se ha mejorado y desarrollado con el paso del tiempo, pero aún implican el uso de químicos y procesos no amigables con el medio ambiente, por lo que se están desarrollando técnicas para mejorar los textiles de origen natural con nuevas y necesarias propiedades adicionándoles materiales biodegradables, no tóxicos como el quitosano, que cambien o mejoren las propiedades originales del material.

El tratamiento químico aplicado a las fibras del algodón que se conoce como acabado final o, en inglés, como “durable press finishing” (DPF, por las siglas en inglés), actualmente tiene mayor interés en la industria textil debido a los cambios en las características y al funcionamiento de los textiles, brindándoles características tales como desodorante, estabilidad dimensional y/o sin arrugas, así como antimicrobianas.

El DPF implica hoy en día el uso de agentes entrecruzantes, principalmente formulados por reactivos de formaldehído; pero éstos reactivos tienen varias desventajas tales como la reducción de propiedades mecánicas, degradación de la fibra y, sobretodo, la liberación de vapores tóxicos e irritantes procedentes del formaldehído durante el proceso del DPF y aún durante el almacenaje (Yang, 1993). Con la finalidad de atacar este problema, los ácidos policarboxílicos se han utilizado como una alternativa a los reactivos de formaldehído, tales opciones han sido el ácido butanotetracarboxílico y el ácido cítrico (AC). Sin embargo, anteriores procedimientos reportados para lograr enlaces covalentes entre el quitosano con textiles de algodón o lana implicaron a menudo el uso de reactivos tóxicos, tales como dialdehído glutárico u otros agentes entrecruzantes (Schiffman y Schauer, 2007; Zhang *et al*, 2003). En lugar de éstos, el ácido cítrico junto con un agente oxidante, tal como permanganato de potasio o hipofosfito de sodio, han mostrado que pueden generar un entrecruzamiento eficaz entre el quitosano y la celulosa por la formación de un enlace éster (Lim y Hudson, 2004a; Chung *et al*, 1998).

El interés de aplicar la microencapsulación en los textiles es el de conferirles fragancias durables, agregar insecticidas o vitaminas para el tratamiento de la piel o agentes

antimicrobianos, entre muchos otros. Se ha demostrado que con la microencapsulation las fragancias pueden quedar en la ropa por períodos de tiempo largos, incluso después varios ciclos de lavado (Nelson, 2002). El uso de insecticidas y de acaricidas en los textiles ha sido investigado por muchos autores, los cuales han reportado que la microencapsulación logra conservar los efectos deseados por períodos significativos sin exponer a los consumidores a productos químicos tóxicos. Alternativamente, para algunos de los insecticidas tóxicos, el uso de compuestos naturales tales como aceites esenciales (AE) encapsulados y fijados en textiles ha hecho posible la fabricación de sábanas con propiedades acaricidas (Yamada *et al*, 1997).

Los aceites esenciales naturales son mezclas volátiles de compuestos complejos con olor fuerte, y son químicamente caracterizados por dos o más de los componentes principales presentes en concentraciones altas dentro de la mezcla, generalmente son compuestos fenólicos y terpenos, los cuales les confieren propiedades antimicrobianas. Esas sustancias son lipófilas, es decir, pueden pasar a través de la pared celular y de la membrana citoplasmática, interrumpir la estructura de diversas capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos y permearlos (Bakkali *et al*, 2008). Recientemente se ha reportado que la capacidad citotóxica de los aceites esenciales (AE) está basada en una actividad pro-oxidativa y son un excelente antiséptico y agente antimicrobiano para uso personal (Bakkali *et al*, 2008). De acuerdo con esto, los aceites esenciales son ampliamente utilizados en sectores alimenticios, farmacéuticos, sanitarios, cosméticos y agrícolas. Entre varios de los AE estudiados y caracterizados, el extracto de la semilla del pomelo o toronja (AET), un producto comercial derivado de las semillas y la pulpa del fruto *Citrus paradisi*, ha demostrado ser un bactericida eficaz, fungicida, antiviral así como tener propiedades antiparasitarias (Reagor *et al*, 2002; Tirillini, 2000)

Se ha reportado que para la microencapsulación de diversos productos usados en textiles funcionales se usan a menudo mezclas de polímeros naturales y sintéticos, los cuales deben cubrir los requisitos legislativos para ser usados como productos cosméticos sin la posibilidad de riesgos para la salud (Nelson, 2002). En este sentido, ya que se ha reportado que el quitosano ha sido usado como matriz para la encapsulación de algunas drogas usadas en la industria farmacéutica (Sinha *et al*, 2004), debido a que no es tóxica, a su capacidad formadora de películas, buena permeabilidad y alta resistencia al quiebre

(Sinha *et al*, 2004; Amiji, 1995), el uso de quitosano para la encapsulación de sustancias útiles para el desarrollo de textiles cosméticos es una opción interesante.

Por otro lado, la radiación con luz ultra violeta (UV) se ha propuesto como un procedimiento conveniente para lograr modificaciones en la superficie de algunos polímeros, generando sitios reactivos que pueden ser usados para la unión de muchos compuestos de interés (Goddard y Hotchkiss, 2007). Ha sido reportado que la exposición de polisacáridos a radiación UV favorece reacciones químicas debido a la degradación fotooxidativa. Este proceso de fotodegradación implica reacciones fotoquímicas, tales como, deshidroxilación y deshidrogenación, las cuales son responsables de la formación de radicales libres en los átomos del nitrógeno o de oxígeno del polisacárido (Goddard y Hotchkiss, 2007; Schiffman y Schauer, 2007; Rabek, 1996).

Por lo anterior, se estudió la fijación de quitooligosacáridos, quitosano y microcapsulas de quitosano con aceite esencial de toronja (AET) en textil de celulosa por medio de su entrecruzamiento mediante métodos no tóxicos, brindándole así al textil las propiedades fisico-químicas y biológicas del quitosano y sus derivados, así como del AET.

4. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que los textiles tradicionales, logran tener principalmente biocompatibilidad, flexibilidad, fuerza, etc., hay un incremento en la necesidad de funciones específicas; por lo que se han desarrollado técnicas en donde es adicionada una sustancia o material sintético o biológico, obteniendo así textiles funcionales con características adecuadas para cubrir las necesidades del mercado actual (Mather, 2001) involucrando hasta ahora el uso de reactivos tóxicos. Es por esto que este estudio para la aplicación del quitosano como aditivo funcional en un textil, en donde se evite el uso de reactivos tóxicos y altas cantidades de energía para su desarrollo y producción es de gran importancia y relevancia biotecnológica.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Funcionalizar y caracterizar textil de celulosa con quitosano, quitooligosacáridos y microcápsulas de quitosano con aceite esencial de toronja como aditivos funcionales por medio del uso de reactivos no tóxicos así como estudiar su propiedad antimicrobiana.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Seleccionar quitosano y quitooligosacáridos, con base a su M_w y GA, por el efecto de estas características sobre la actividad antimicrobiana para su uso como aditivos en textil de celulosa.
2. Establecer condiciones para el entrecruzamiento químico, así como tiempo de irradiación con luz ultra violeta, concentración del agente entrecruzante y catalizador para la funcionalización del textil.
3. Establecer concentración del aceite esencial de toronja, con base a su efecto antimicrobiano, para ser microencapsulada en quitosano así como su posterior fijación por entrecruzamiento químico en el textil de celulosa.
4. Caracterizar los textiles obtenidos y evaluar su actividad antimicrobiana.

6. HIPÓTESIS

El entrecruzamiento químico de quitosano en textil de celulosa mediante un agente entrecruzante grado alimenticio y un catalizador no-tóxico asegurarán la permanencia del quitosano en el textil aún después de ser lavado; además del uso de aditivos que incrementen las propiedades antimicrobianas del textil funcional y que le brinde propiedades adicionales.

7. CARACTERIZACIÓN DE QITOSANO Y QUITOOLIGOSACÁRIDOS.

7.1. Materiales y Métodos

7.1.1 Caracterización del quitosano

Esta caracterización se realizó a 3 diferentes quitosanos comerciales (Heppe GmbH, Alemania) con la finalidad de seleccionar un biopolímero para realizar los estudios de entrecruzamiento con la celulosa. Para tal fin, se emplearon las siguientes metodologías:

- **Grado de desacetilación (GD).** Se determinó el grado de desacetilación por el método espectrofotométrico con la primera derivada UV/Visible (Muzarelli y Rochetti, 1985). Para lo que fue necesario disponer de una curva estándar de N-acetil-glucosamina (NAG) (Anexo 1)
- **Peso Molecular (M_w).** El peso molecular del quitosano representa una media de los pesos de las moléculas presentes en la muestra. Se obtuvo con base en su viscosidad intrínseca. Para lo cual se consideran varios factores, por lo que se pueden emplear varias ecuaciones como la de Huggins-Kraemer que nos brinda coeficientes cuyos valores se calculan a partir de las pendientes de rectas que se obtienen al representar simultáneamente la η_{sp}/c y el $\ln(\eta_{red}/c)$ frente a la concentración (Galed, 2004), Anexo 1.
- **Viscosidad.** La viscosidad de las soluciones se ve afectada por diversos factores como el grado de desacetilación, el peso molecular, la concentración de la solución, la fuerza iónica, el pH, la temperatura, y el tipo de ácido o disolvente utilizado. Por lo general, un incremento en la temperatura da como resultado una disminución en la viscosidad de la solución (Li *et al*, 1997). La determinación de esta característica se realizó a cada una de las soluciones de los quitosanos comerciales con la ayuda de un viscosímetro tipo Ubbelohde descrito anteriormente.
- **Contenido de humedad.** Este parámetro fue determinado por gravimetría. Se coloca una muestra de cada quitosano en un pesa filtros de vidrio, éste último con peso constante conocido, en una estufa de vacío a 105°C hasta no tener variación en el peso de la muestra de quitosano. La diferencia de peso es la cantidad de agua contenida en la muestra (A.O.A.C. 1980).

- **Contenido de cenizas.** Éstas son un indicativo del contenido de materiales inorgánicos presentes en el quitosano. El contenido de cenizas dependerá de la temperatura usada para la combustión de la muestra. En este caso se realizó la determinación gravimétrica a partir del residuo obtenido tras la combustión de la muestra durante 7 horas en una mufla (NEYTech Vulcana 130, Canada) a 800°C. Se puso la muestra de quitosano (en crisoles previamente puestos a peso constante, tarados, luego se colocaron en la mufla y, después de transcurrido el tiempo, se colocaron en un desecador hasta enfriarse y poder pesar los restos de la muestra. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado (A.O.A.C. 1980).

7.1.2 Caracterización de los quitooligosacáridos

Los quitooligosacáridos (Kitto Life Co., Ltd. Seul, Corea), de dos diferentes lotes, C1 y C2, fueron fraccionados mediante permeación en gel (GPC), utilizando la metodología descrita por Bahrke *et al* (2002), Anexo 1. Una vez fraccionados fueron analizados por MALDI-Tof para su completa caracterización (Anexo 1).

7.2 Resultados y Discusión.

7.2.1 Caracterización del quitosano

Con los resultados obtenidos en la caracterización de los quitosanos presentados en la Tabla 3, se puede observar que los 3 quitosanos comerciales caracterizados tienen un contenido de cenizas menor o igual al 1.4%, un GA de aproximadamente del 20% y M_w de aproximadamente 625.4×10^3 Da; el quitosano 85/4000/A1 (clave del fabricante) fue el seleccionado para el estudio de entrecruzamiento con la celulosa por ser el de más bajo peso molecular y mayor grado de desacetilación (387.9×10^3 Da y 81.14%), menor viscosidad en solución acuosa y menor contenido de cenizas.

Tanto el M_w como el GA del quitosano son variables que tienen un efecto sobre las propiedades antimicrobianas, ya que el GD (grado de desacetilación) indica el porcentaje de grupos aminos disponibles para que se lleve a cabo el mecanismo inhibitorio por interacción iónica con los microorganismos. Entre mayor sea ese porcentaje, se espera que haya una

mayor inhibición; mientras que el M_w podría tener influencia en la distribución del quitosano en el textil (Shin *et al*, 2001).

Tabla 3. Caracterización de quitosanos comerciales

Muestras	Características Evaluadas				
Quitosano* (Características del fabricante)	Cenizas	Humedad	Grado Desacetilación	Peso Molecular (Da)	Viscosidad (cp)
85/500/A1	0.78%	11.42%	83.72%	622.9×10^3	443.1
80/4000/A1	1.4%	11.98%	69.80%	865.5×10^3	601.6
85/4000/A1	0.64%	10.98%	81.14%	387.9×10^3	285.2

*Clave de la muestra de quitosano: indica el GA, la viscosidad y el porcentaje de cenizas reportado por el fabricante. El 85 y 80 corresponden al % de desacetilación y el 500 y 4000 corresponden a la viscosidad; el A1 indica que tienen menos del 1% de cenizas.

7.2.2 Caracterización de los quitooligosacáridos

Las fracciones obtenidas para cada uno de los lotes de quitooligosacáridos se presentan en el cromatograma correspondiente a cada lote en la figura 6a y 6b. Estas fracciones fueron analizadas por MALDI-Tof.

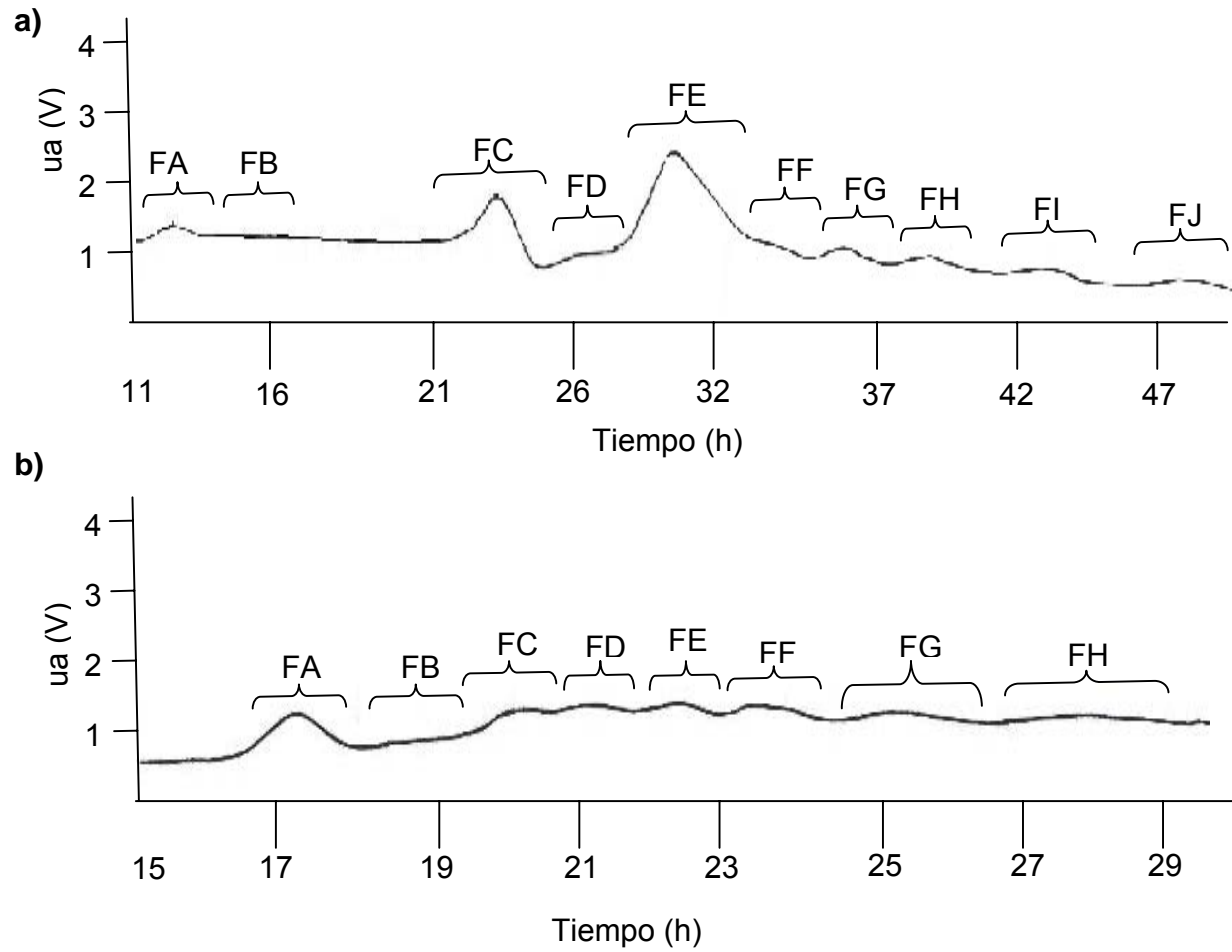


Fig. 6. Cromatograma de las fracciones de oligosacáridos obtenidos por permeación en gel de: **a)** lote de quitooligosacáridos C1, **b)** lote de quitooligosacáridos C2.

Para el lote de oligos llamado C1, se obtuvo un M_w promedio de ~12890 Da y un GP promedio de 8.5, y un rango desde dímeros hasta de 15 unidades (Tabla 4). Este lote presentó una moda de grupos acetilados de 0, es decir, los grupos con 0 unidades acetiladas fueron los de mayor frecuencia dentro de la distribución de los datos obtenidos. Pero este lote también presentó ciertos decámeros y trímeros acetilados, siendo la abundancia de estos considerable en relación con el mayor oligosacárido (15 unidades) obtenido en este lote, el cual está totalmente desacetilado (Figura 7).

Tabla 4. Descripción de los quitooligosacáridos del lote C1.^a

Oligómeros	Homólogos	Grupos acetilados	M _w (Da)	M _w Promedio (Da)	F _A	GP Promedio
GP15	D15+Na	0	2456.8			
GP14	D14+Na	0	2295.7			
GP13	D13+Na	0	2134.6			
GP12	D12+Na	0	1973.6			
GP11	D10A1	1	1854.6		0.5	
	D11+Na	0	1812.6			
GP10	D9A1	1	1693.6		0.5	
	D10+Na	0	1651.6			
GP9	D8A1	1	1532.6		0.5	
	D9+Na	0	1490.5			
GP8	D7A1	1	1371.5		0.5	
	D8+Na	0	1210.5			
GP7	D6A1	1	1168.5		1.0	
GP6	D4A2	2	1091.5			
	D5A1	1	1049.4		0.66	
	D6+Na	0	1007.4			
GP5	D3A2	2	930.8		0.66	
	D4A1	1	888.4			
	D5+Na	0	846.3			
GP4	D2A2	2	769.3		0.66	
	D3A1	1	727.3			
	D4+Na	0	685.3			
GP3	D2A1	1	566.3		0.5	
	D3+Na	0	524.3			
GP2	D2+Na	0	363.3			
				1283.85	0.608	8.5

^aObtenidos con base en los resultados del análisis por MALDI-ToF.

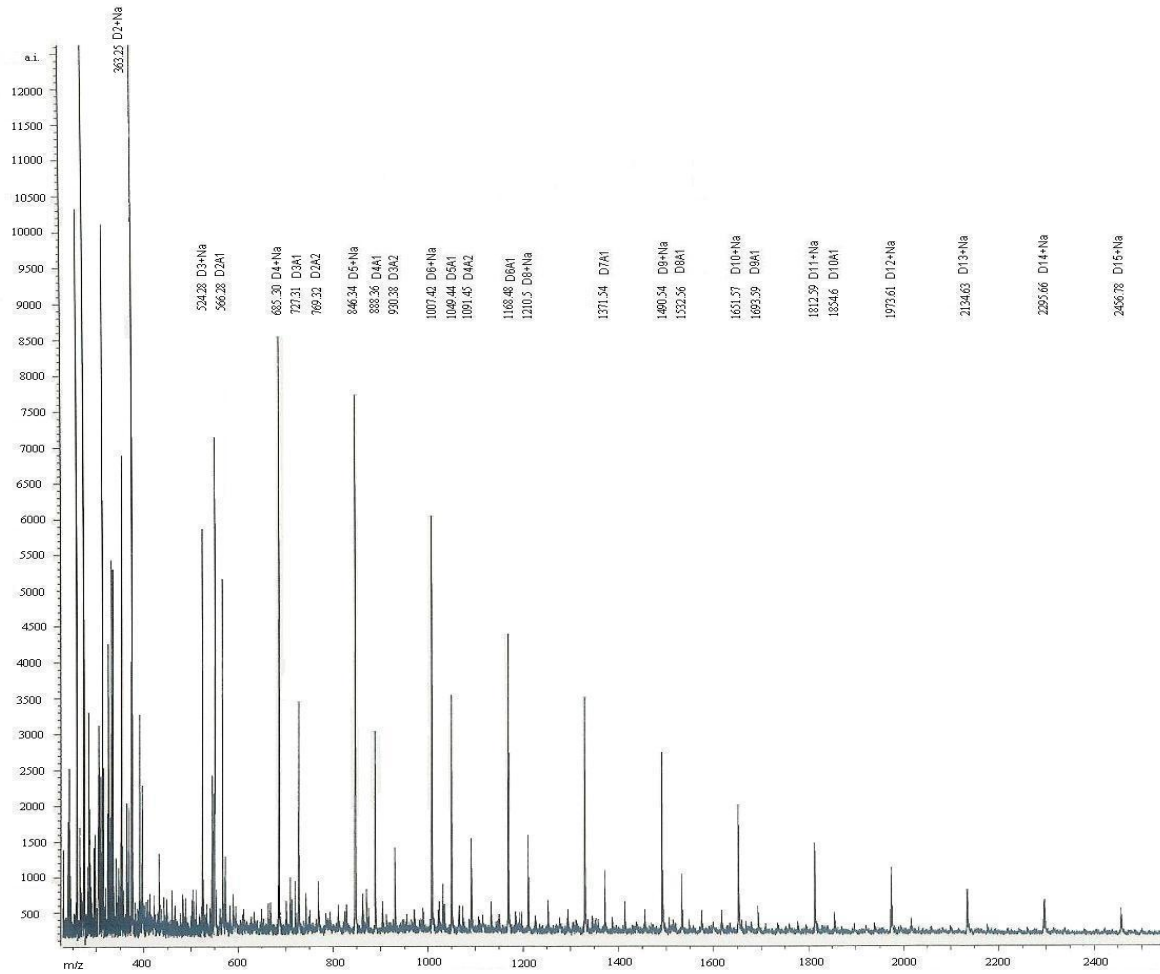


Fig. 7. Espectro de masas por MALDI-ToF, del lote de quitooligosacáridos C1.

Al contrario, el lote llamado C2, Tabla 5, el oligosacárido obtenido menor fue de un M_w de ~360 Da, el cual corresponde a un dímero y el oligosacárido mayor fue de un M_w de ~1813 Da que corresponde a un oligo de 11 unidades desacetiladas. Este lote tuvo un GP promedio de 6.5 y una moda de grupos acetilados también de 0; los homólogos acetilados presentes fueron de oligos de tamaño relativamente grande de entre 7 y 11 unidades monoméricas con no más de una unidad acetilada, pero desde los hexámeros hasta los dímeros obtenidos estuvieron totalmente desacetilados. La intensidad de éstos fue más alta que la de los homólogos acetilados (Figura 8), esta información es relevante por su efecto sobre los microorganismos, ya que el efecto antimicrobiano de los derivados de quitosano, al igual que éste, es atribuido al intercambio de cargas entre el grupo amino libre de la glucosamina con la pared celular del microorganismo.

Tabla 5. Descripción de los quitooligosacáridos del lote C2.^a

Oligómeros	Homólogos	Grupos acetilados	M _w (Da)	M _w Promedio (Da)	F _A Promedio	GP Promedio
GP11	D11+Na	0	1812.8			
GP10	D9A1	1	1693.8		0.5	
	D10+Na	0	1651.8			
GP9	D7A2	2	1574.8		0.66	
	D8A1	1	1532.8			
	D9+Na	0	1490.8			
GP8	D7A1	1	1317.8		0.33	
	D8+Na	0	1329.7			
	D8+1	0	1307.7			
GP7	D6A1	1	1210.67		0.5	
	D7+Na	0	1168.7			
GP6	D6+Na	0	1007.6			
	D6+1	0	985.5			
GP5	D5+Na	0	846.5			
	D5+1	0	824.0			
GP4	D4+Na	0	685.4			
	D4+1	0	663.4			
GP3	D3+Na	0	524.3			
	D3+1	0	502.3			
GP2	D2+Na	0	363.3			
				1124.68	0.497	6.5

^aObtenidos con base en los resultados del análisis por MALDI-ToF.

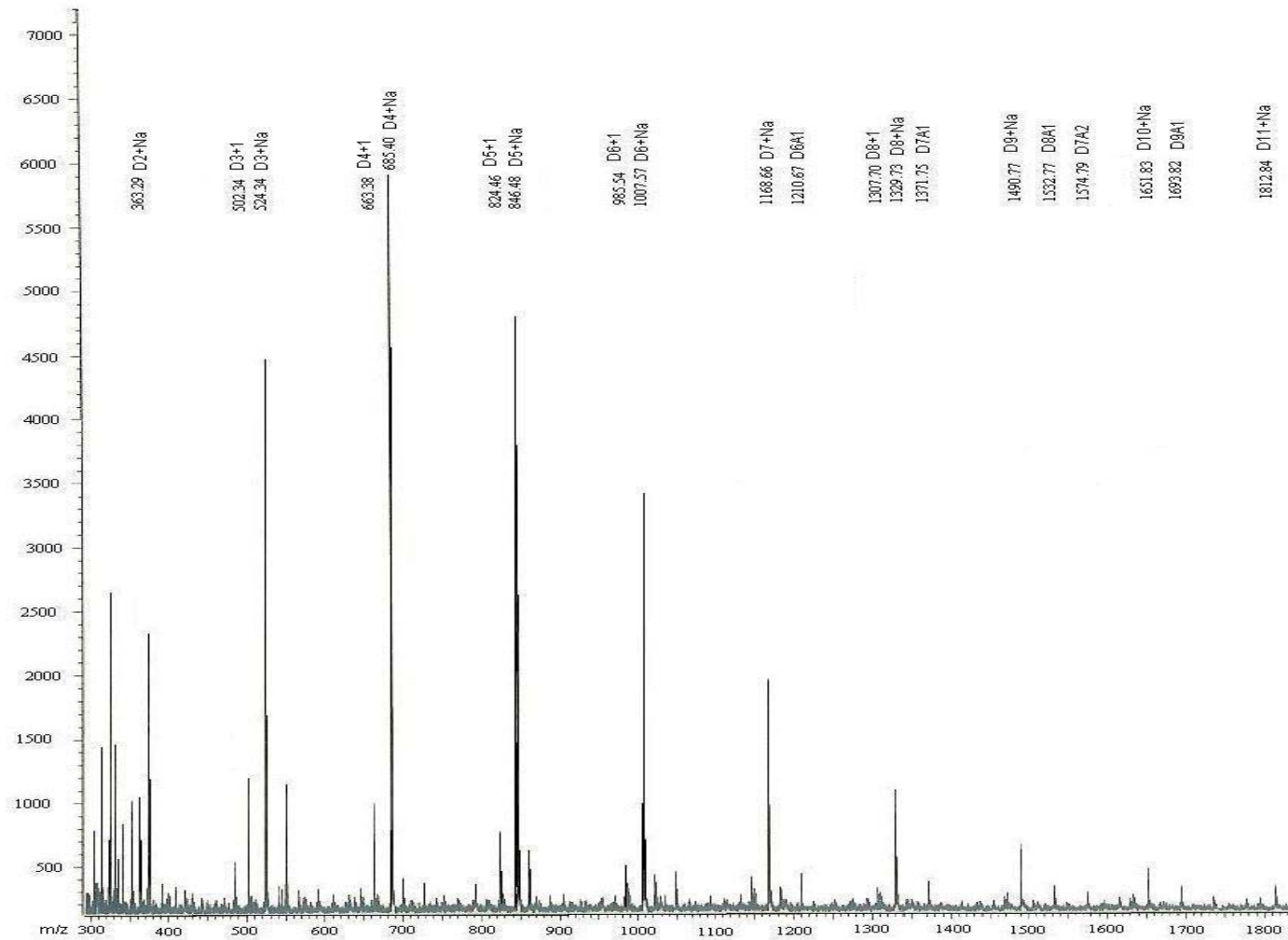


Fig. 8. Espectro de masas por MALDI-ToF, del lote de quitooligosacáridos C2.

8. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUITOOLIGOSACÁRIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS.

8.1 Materiales y Métodos

8.1.1 Microorganismos y Reactivos.

Escherichia coli (NRRLB 14218, de la colección USDA ARS) y *Bacillus subtilis* (NRRLB 3411, de la colección USDA ARS) las cuales fueron cultivadas y mantenidas a 4°C en agar nutritivo (Bioxon, USA) hasta su posterior uso.

Lactobacillus plantarum (APG Eurozym) el cual fue cultivado y mantenido a 4°C en agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) hasta su posterior uso. La composición del medio de cultivo MRS (g/L) fue: peptona proteasa (10), extracto de res (10), extracto de levadura (5), dextrosa (20), Tween-80 (1), $(\text{NH}_4)_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$ (2), $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ (5), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1), MnSO_4 (0.05), K_2HPO_4 (2), todos grado reactivo (JT Baker, E.U.A) más agar bacteriológico (15) (Bioxon, E.U.A) sólo para el medio sólido.

Quitooligosacáridos comerciales (Kitto Life Co., Ltd. Seul, Corea) usados sin tratamiento posterior a su recepción, dos diferentes lotes, identificados como C1 y C2.

8.1.2 Determinación del crecimiento de los cultivos bacterianos.

Las cepas, Gram-negativa y Gram-positiva, fueron inoculadas en medios de cultivo e incubadas durante 24h a 37°C, 30°C y 35°C para *E. coli*, *B. subtilis* y *L. plantarum*, respectivamente. Estos cultivos fueron inoculados en micropozos en microplacas como testigo. Otra serie de microplacas contenían los medios de cultivo y quitooligosacáridos (COS) en concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 g/L. El desarrollo de las bacterias fue determinada mediante densidad óptica (Anexo 2).

8.1.3 Determinación de la tasa específica de crecimiento bacteriano

Ésta se realizó usando como control puro medio de cultivo inoculado con el lote de células que llamamos madre, en microplacas y se procedió como se describió en el punto

8.1.2 de éste capítulo (Anexo 2), pero tomando lectura de la densidad óptica (DO) cada 3h, hasta un tiempo final de 24h. Ajustando los valores experimentales obtenidos con la ecuación exponencial usando el programa Origin 7.0 SR0:

$$y(t) = ae^{(bt)} \quad (1)$$

donde y es el número de células (X_t en ufc/mL) a determinado tiempo, a es el valor inicial (X_0 en ufc/mL), b es la tasa específica de crecimiento (μ_{\max} en h^{-1}).

8.2 Resultados y Discusión

8.2.1 Determinación del crecimiento bacteriano

Los quitoooligosacáridos de los lotes C1 y C2 mostraron actividad antimicrobiana sobre la bacteria *E. coli* (Gram-negativa). Cuando el lote de oligos C1 fue usado a concentraciones mayores de 1g/L este efecto inhibitorio se incrementó, y se obtuvo un 100% de inhibición de la cepa; mientras que cuando se usó el lote C2, fue necesaria una concentración de 5 g/L, con ambos lotes, esta inhibición se determinó hasta después de 24h de incubación a 37°C (Figura 9a y 9b). Estos resultados son similares a lo reportado por Jeon y Kim (2000) quienes obtuvieron una inhibición total de *E.coli* con una concentración de 5g/L de oligosacáridos, los cuales eran en su mayoría pentámeros y hexámeros, siendo el 80% de sus oligosacáridos hexámeros. En nuestro estudio los oligosacáridos desacetilados del lote C2 y C1 son desde heptámeros hasta dímeros, por lo que el efecto antibacteriano con éstos puede ser atribuido a las interacciones de los cationes de los grupos amino de los COS con los grupos aniónicos de la pared celular formando poli electrólitos complejos con la bacteria, de tal manera que se forma una capa impermeable alrededor de la célula que impide el transporte de nutrientes esenciales hacia la célula.

Con la bacteria ácido láctica *Lactobacillus plantarum* (Gram-positiva) se observó un aumento en la absorbancia con el aumento de la concentración de los COS; este comportamiento fue observado con ambos lotes, C1 y C2 (Figura 9a y 9b). Se observó que los COS presentaron un efecto prebiótico con esta bacteria, la cual es benéfica comúnmente encontrada en alimentos fermentados y presente en la saliva humana, de donde

originalmente fue aislada (Beijerinck, 1901). El mecanismo de este efecto no está aún explicado, pero se ha reportado que se presenta en mayor medida en presencia de COS altamente desacetilados y con un grado de polimerización (GP) de entre 2 y 8 unidades (Lee *et al*, 2002). El GP promedio de los COS de los lotes usados en este estudio es de 8 a 6. El lote C2 presentó oligómeros totalmente desacetilados de 2 a 7 unidades y con este lote se obtuvieron absorbancias más altas, i.e. mayor crecimiento de la bacteria ácido láctica. No *et al*, (2002) determinó que *Lb. plantarum* no presentó ni inhibición ni crecimiento, esto probando COS con un M_w de 1000 Da; peso molecular similar al aquí usado; pero, en ese caso, no reportaron el grado de acetilación.

Para la bacteria Gram-positiva, *Bacillus subtilis*, no se obtuvo inhibición cuando se incrementaron las concentraciones de COS. Con el lote C1 se puede decir que no hubo ni inhibición ni crecimiento de esta cepa. Como se puede comprobar con los resultados del análisis de varianza realizada (ANDEVA), reportadas en el anexo 2, para esta cepa con éste lote de COS, no hay diferencia entre las concentraciones de 1 a 5g/L. Pero con el lote de COS C2 se determinó que con las concentraciones de 0.5 a 2g/L de COS no hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) en la densidad óptica, es decir, que no hay ni crecimiento ni inhibición. Sin embargo, con las concentraciones de 3 a 5 g/L si se observaron diferencias, con efecto favorecedor sobre la cepa al aumentar la concentración del oligosacárido (Figura 9a y 9b).

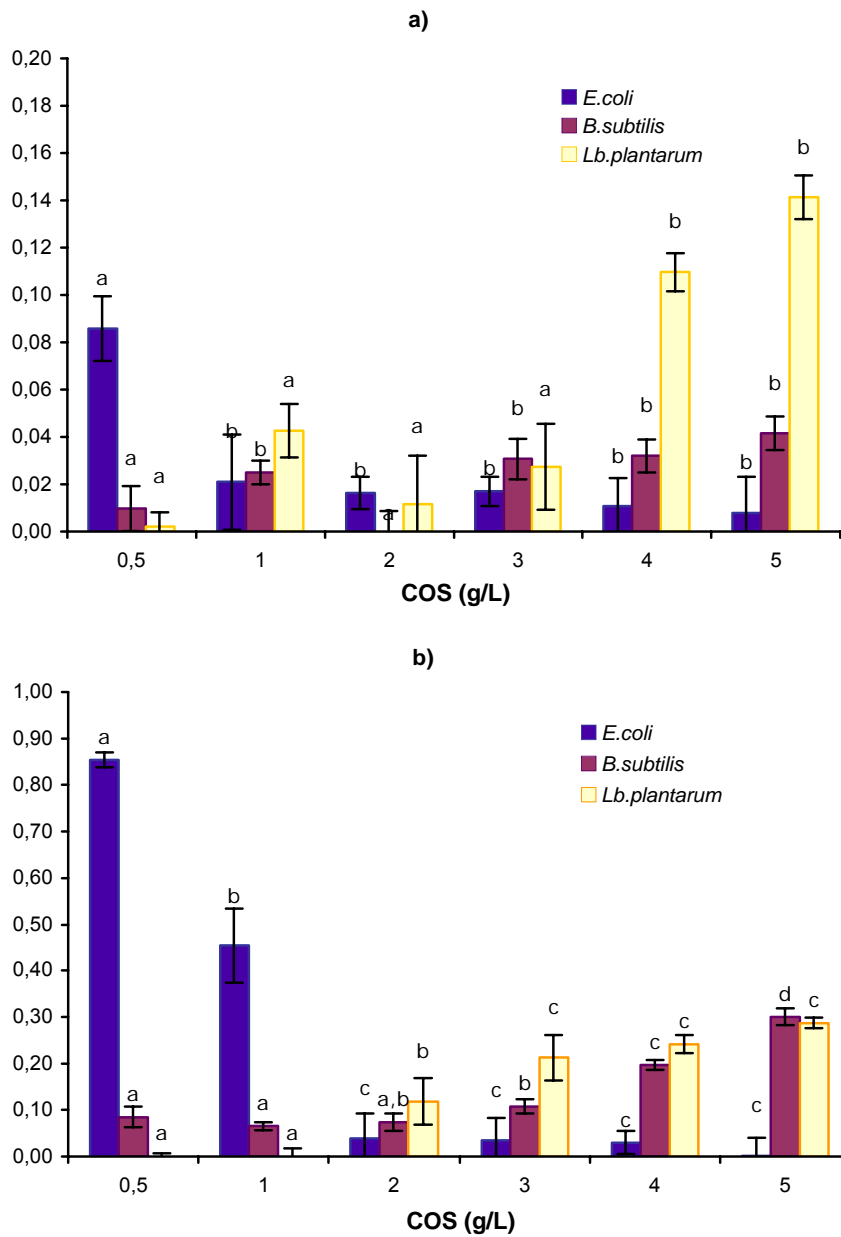


Fig. 9. Crecimiento de *E.coli*, *B.subtilis* y *L.plantarum* en presencia de COS a diferentes concentraciones: **a)** lote C1, **b)** lote C2.

Este efecto, ligeramente similar al presentado con la bacteria ácido láctica, se puede atribuir a que ambas son bacterias gram-positivas, entonces el efecto de los COS sobre las diferentes especies de bacterias puede ser atribuido a la composición de la pared celular

(Uchida *et al*, 1989) así como al M_w del COS. En otro trabajo (Jeon *et al*, 2001) con COS donde evaluaron el peso molecular para la inhibición de varias cepas tanto gram-positivas como gram-negativas, entre ellas *E.coli* y *B.subtilis*, cuando evaluaron COS con un GP de 6 y 5, obtuvieron un efecto bactericida sobre *E. coli* del $51\pm 7\%$, mientras que con *B. subtilis* fue hasta del 70%, mostrando con eso que las bacterias gram-positivas son más sensibles a los COS de peso molecular bajo; sin embargo, en ese estudio no presentaron información sobre el GA de los oligosacáridos usados y como se mencionó antes, esto es de gran relevancia.

Como se mostró en este trabajo de investigación, el peso molecular de los quitoooligosacáridos aquí usados tuvo un efecto inhibitorio o benéfico sobre ciertas cepas. El valor del peso molecular de los oligosacáridos evaluados en este trabajo fue similar a los COS de bajo peso molecular ($\sim 1000\text{Da}$) usados por Jeon *et al* (2001), en donde obtuvo un efecto similar al aquí determinado. Pero el efecto benéfico sobre la bacteria ácido láctica aquí reportado puede ser atribuido al bajo grado de acetilación presente en ambos lotes de oligosacáridos usados, como se observó por medio de los análisis de MALDI-Tof.

Debido a ese efecto benéfico observado con *Lb.plantarum* se realizó una cinética para la determinación de la tasa específica de crecimiento de esta cepa en presencia de los COS y el efecto de la concentración sobre ésta.

Los resultados de las tasas específicas se presentan en la Tabla 6, en donde se puede observar que, en relación al control, las tasas con ambos lotes se ven reducidas. Esto es más notable con el lote de COS C1 cuando se usó una concentración de 4 g/L o más, pues la tasa obtenida es de casi la mitad del tiempo que con el control y de la cuarta parte del tiempo cuando se usó la concentración de 5 g/L. Por el contrario, no se observa gran diferencia a las diferentes concentraciones usadas con el lote C2, ni entre ellas ni con el control.

Tabla 6. Tasas específicas de crecimiento (μ)^a para *Lb. plantarum* obtenidas en presencia de quitooligosacáridos.

COS	Concentración (g/L)	μ (h ⁻¹)	R ²
Control	0	0.08±0.007	0.894
	3	0.06±0.003	0.868
C1	4	0.04±0.004	0.860
	5	0.02±0.002	0.909
Control	0	0.07±0.006	0.872
	3	0.06±0.007	0.843
C2	4	0.05±0.006	0.890
	5	0.06±0.004	0.928

^aEstimada con un modelo exponencial con los datos de D.O. obtenidos por triplicado y usando la Ec.1

8.3 Conclusiones

El efecto inhibitor o benéfico de los quitooligosacáridos con ciertos microorganismos fue determinado y dependió del peso molecular, grado de polimerización y grado de acetilación de los quitooligosacáridos, sirviendo así ésta parte del trabajo como antecedente para una futura investigación más detallada.

9. FUNCIONALIZACIÓN DE TEXTIL DE CELULOSA CON QUITOSANO Y QUITOOLIGOSACÁRIDOS Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

9.1 *Materiales y Métodos*

9.1.1 Reactivos

Quitosano comercial (Heppe GmbH, Alemania), fue usado tal cual fue recibido. Quitooligosacáridos comerciales (Kitto Life Co., Ltd. Seul, Corea) usados sin tratamiento posterior a su recepción, dos diferentes lotes, los cuales identificamos como C1 y C2. Ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) y fosfato de sodio (NaH_2PO_4), ácido acético ($C_2H_4O_2$) todos grado reactivo (JTBaker, E.U.A).

Textil de celulosa cruda, fue donado por casa Miyako (México); textil de celulosa comercial químicamente tratada con sales cuaternarias de amonio para inhibir el crecimiento de microorganismos, obtenida con Comercializadora del Río (México).

9.1.2 Microorganismos.

Penicillium chrysogenum (CECT 2267, Colección Española de Cultivo Tipo), la cual se mantuvo liofilizada a $-20^{\circ}C$ hasta su activación en caldo dextrosa Sabouraud (Bioxon, USA) y posterior incubación a $25^{\circ}C$ en agar papa dextrosa (PDA). *Escherichia coli* (NRRLB 14218, de la colección USDA ARS) la cual fue cultivada y mantenidas a $4^{\circ}C$ en agar nutritivo (Bioxon, E.U.A) hasta que fue usada.

Después de 5 días de incubación a $25^{\circ}C$ en medio PDA, fueron resuspendidas las esporas de *P. chrysogenum* en una solución de Tween-80 al 0.1% v/v, y contadas en una cámara Neubauer con microscopio óptico (Axiostar-Plus Zeiss, Alemania) hasta una concentración de 1×10^5 esporas/mL, para tener una suspensión de esporas usada como inóculo para todos los experimentos.

La bacteria fue inoculada en 50 mL de medio nutritivo, e incubada a 37°C por 24 h. A partir de ahí se realizaron soluciones decimales en NaCl 0.09% p/v y sembradas en placa. La suspensión de células usada para los experimentos fue de 1×10^7 ufc/mL.

9.1.2.1 Medios de cultivo

Medio agar-dextrosa-papa (PDA), (Bioxon, E.U.A), para el cultivo de la cepa de *P. chrysogenum*, la cual posteriormente fue inoculada en medio líquido Czapeck que contiene (g/L): Sacarosa (30), NaNO₃ (1), MgSO₄·7H₂O (0.5), KCl (0.5), K₂HPO₄·3H₂O (1), FeSO₄·7H₂O (0.01), todos de grado reactivo (JT Baker, E.U.A.).

Para la bacteria *E.coli* se usó medio nutritivo comercial (Bioxon, E.U.A), usando (g/L): Medio (8), sacarosa (20) y agar bacteriológico (15) sólo cuando fue necesario usar medio sólido (Bioxon, E.U.A).

9.1.3 Tratamiento para la funcionalización del textil de celulosa con quitosano y con los quitoooligosacáridos.

Textil de celulosa (Casa Miyako, México), sin tratamiento previo como blanqueado o almidonado, fue pesado, cortado y medido; se puso en contacto con la solución de quitosano respectiva, las cuales son descritas a continuación:

- a) Con solución de quitosano al 1.5% p/v de ácido acético 0.1M: éste se dividió en 3 lotes y se agregó ácido cítrico (AC) como agente entrecruzante al 4, 8 y 12% p/v respectivamente.
- b) Con solución de quitosano al 1.5% p/v en AC al 4, 8 y 12% p/v de agua destilada, teniendo al AC como agente entrecruzante y como disolvente; a estos otros 3 lotes, se agregó en cada uno NaH₂PO₄ al 2.3% p/v como catalizador para una reacción de esterificación.
- c) Con solución de quitosano al 1.5% p/v en AC al 4% p/v, dejando fija la concentración del entrecruzante, se dividió en 2 lotes y se agregó el catalizador, NaH₂PO₄, a 9.2% p/v y 18.4% p/v, respectivamente.
- d) Con solución de quitosano al 1.5% p/v en AC al 8% p/v, y se agregó el catalizador en una relación 1:1 con el entrecruzante, adicionando así 4.6% p/v del NaH₂PO₄.

e) Con solución de quitosano al 1.5% p/v en AC al 12% p/v, y se agregó el catalizador en una relación 1:1 con el entrecruzante, adicionando así 6.9% p/v del NaH_2PO_4 .

Con todos estos lotes se procedió con un tratamiento térmico a $70^\circ\text{C}/5\text{min}$, durante el cual fue adicionado el catalizador, NaH_2PO_4 y posteriormente se curó en seco en un horno a $130^\circ\text{C}/3\text{min}$.

Por otro lado, lienzos de celulosa, crudos, sin tratamiento previo, como se describió anteriormente, fueron previamente irradiados con luz UV con una intensidad de 254nm, durante 4, 8 y 20 h. Estos fueron tratados con:

f) Una solución de quitosano al 1.5% disuelto en AC al 4% p/v en agua destilada, y durante el pretratamiento térmico se agregó el catalizador, NaH_2PO_4 , con una concentración de 2.3% p/v, dejando así fijos la concentración del catalizador y del agente entrecruzante, pero variando el tiempo de exposición a la luz UV. Se procedió con el tratamiento térmico y el curado como se describió previamente.

Un lote del textil de celulosa cruda, previamente irradiada con luz UV durante 8h, como se describió previamente, fue tratada por último con:

g) Soluciones de quitooligosacáridos C1 y C2, ambos al 3% p/v y disueltos en una solución acuosa del agente entrecruzante, AC, al 4% p/v. Se adicionó el catalizador, NaH_2PO_4 , al 2.3% p/v y se procedió con el tratamiento térmico y curado antes descrito.

Las muestras con quitosano (Tabla 7) y con quitooligosacáridos (Tabla 8) se dejaron secar a temperatura ambiente después del curado, se lavaron con jabón aniónico común, se enjuagaron con agua destilada y posteriormente se les dio un lavado con ácido acético 0.1M, se volvieron a enjuagar con agua destilada y se dejaron secar por la noche.

Tabla 7. Composición de las mezclas para los tratamientos de funcionalización de textiles de celulosa con quitosano^a.

Clave Muestra	Acido Acético ^b (M)	Acido Cítrico (%(p/v))	NaH ₂ PO ₄ (%(p/v))	Tiempo de Irradiación-UV ^c (h)
1	0.1	4	0	0
2	0.1	8	0	0
3	0.1	12	0	0
4	0	4	0	0
5	0	4	2.3	0
6	0	8	2.3	0
7	0	12	2.3	0
8	0	4	2.3	4
9	0	4	2.3	8
10	0	4	2.3	20
11	0	8	2.3	8
12	0	12	2.3	8
13	0	4	9.2	0
14	0	4	18.4	0
15	0	8	4.6	0
16	0	12	6.9	0

^aTodas las muestras fueron tratadas con quitosano al 1.5 %(p/v) y con un pretratamiento a 70 °C/5min, curado a 130 °C/3min. ^bSolución de ácido acético al 0.1M como disolvente para el quitosano. ^cIrradiación con UV a lienzos de textil de celulosa, previo a los tratamientos con soluciones de quitosano.

Tabla 8. Composición de las mezclas para los tratamientos de funcionalización de textiles de celulosa con quitooligosacáridos^a.

Clave Muestra	Quitooligosacárido (%(p/v)) ^a	Acido Cítrico (%(p/v))	NaH ₂ PO ₄ (%(p/v))	Tiempo de Irradiación-UV ^b (h)
C1	3	4	2.3	8
C2	3	4	2.3	8

^aLas muestras fueron tratadas la solución de quitooligosacáridos con un pretratamiento a 70 °C/5min, curado a 130 °C/3min. ^bIrradiación con UV a lienzos de textil de celulosa, previo a los tratamientos con soluciones de quitooligosacáridos.

9.1.4 Caracterización del textil funcionalizado.

Por medio de análisis elemental (CHN, Perkin Elmer serie 2400, E.U.A) se determinó la cantidad de quitosano incorporado al textil de celulosa, por la cuantificación de nitrógeno, proveniente del grupo amino del quitosano y de los quitooligosacáridos.

Se realizó una modificación de la técnica colorimétrica con ninhidrina reportada por Chung *et al* (1998), para la determinación de la concentración de grupos amino libres del quitosano presente en el textil de celulosa y provenientes del quitosano o de los quitooligosacáridos. Pues La ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno, $C_9H_6O_4$) es un químico usado comúnmente para detectar amoniaco o grupos aminos primarios y secundarios. Cuando reacciona con grupos amino libres se observa un color púrpura azulado conocido como Ruhemann púrpura, cuando estos no están libres o están enlazados no hay coloración. Esta coloración se logra por una reacción en donde la amina es condensada con una molécula de ninhidrina dando lugar a una base de Schiff, por lo que sólo el amoniaco y las aminas primarias pueden seguir delante después de este paso. En dicho paso debe haber un protón alfa para transferirse a la base de Schiff, por lo que una amina adyacente a un carbono terciario no puede ser detectada con ésta técnica. La reacción de ninhidrina con aminas secundarias da una sal iminica, que es una imina substituida cuya estructura general es: $RR'C=NR''$, donde R'' puede ser un H o un grupo orgánico (Kaiser, 1970).

Para esta técnica las muestras tratadas fueron pulverizadas y se agregaron de una en una a 1 mL de agua destilada en tubos de ensaye con rosca, seguido de la adición de la solución de ninhidrina (Beckman Coulter, E.U.A). Siguiendo el procedimiento similar al reportado por Sun *et al*, (2006) (Anexo 3). Las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Se determinó la adición del biopolímero a la celulosa (CP) con la ecuación 2:

$$CP(\%) = \left(\frac{100(P_2 - P_1)}{P_1} \right) \quad (2)$$

donde P_1 y P_2 son los pesos de los materiales en base seca antes y después del proceso de entrecruzamiento.

Análisis termogravimétrico (TGA) fue realizado en un Perkin Elmer, Pyris 1 (Connecticut, USA) con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min con un intervalo de 30 °C-450°C.

Con el método de FTIR en estado sólido (pastilla de KBr) se analizaron las muestras de cada una de las etapas del proceso de entrecruzamiento de las muestras tratadas así como del algodón sin tratar y el quitosano usado, con un espectrofotómetro FTIR (Perkin Elmer, E.U.A). Cada muestra fue escaneada 120 veces, en un intervalo de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} .

Para la observación de los cambios morfológicos de las muestras tratadas, éstas fueron cubiertas con carbón y posteriormente con oro, previo a su observación en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900 KV, Tokio Japón).

Se realizó la observación del ángulo de contacto en la superficie del textil de celulosa y de los materiales funcionalizados, agregando 2 μL de agua (una gota) y calculando el ángulo con el microscopio Intel® QX3 (Intel, E.U.A) con la finalidad de determinar el cambio en la hidrofobicidad del material funcionalizado por la presencia del quitosano, ya que éste es hidrofílico y se deseó observar el cambio debido a la esterificación.

9.1.4 Determinación de crecimiento de biomasa y tasa de germinación por efecto del textil funcionalizado.

Se inocularon 40 mL de medio líquido Czapeck en matraces de 125 mL, una concentración de 1×10^5 esporas/mL de *P. chrysogenum*. En cada matraz se colocó 2 cm^2 del textil tratado y de los blancos (gasa comercial y textil de algodón crudo sin tratamiento previo) así como un control de medio líquido sin textil tratado. Se incubaron a 25°C con agitación a 200 rpm. Las muestras fueron tomadas por duplicado cada 6 h hasta un tiempo final de 120 h y por el método gravimétrico, se determinó la cantidad de biomasa de *P.*

chrysogenum a diferentes tiempos, filtrando con papel filtro Whatman No.40 el medio con la muestra del textil tratado.

Para la determinación de la tasa de germinación se agregaron 24 cubreobjetos en matraces de 125 mL con 40 mL de medio Czapeck, los cuales iban siendo retirados, cada 2 h hasta cubrir 24 h; las esporas se fijaron en los cubreobjetos usando una solución de 3.7% de formaldehído, 0.2% Triton X-100 y solución amortiguadora de fosfatos 50mM, pH7. Posteriormente, se contaron las esporas en un microscopio óptico marca Zeiss, modelo Axiostar-plus, a 40x, contando 200 esporas en total de cada muestra, germinadas y no germinadas; se consideran germinadas cuando el largo del tubo germinal alcanzó la mitad del diámetro de la espora, siguiendo la metodología reportada por Smilanik *et al* (1990).

De los datos de germinación y biomasa con *P. chrysogenum* se realizó un ajuste con un modelo logístico con el programa Origin 7.0 SR0, con base en la siguiente ecuación 3.

$$y(t) = \frac{a}{1 + e^{(b-ct)}} \quad (3)$$

donde y es el porcentaje de esporas germinadas después de un tiempo (S_t en %) o la biomasa (X_t en mg/mL), a es el valor inicial (S_0 en %, o X_0 en mg/mL), b es el máximo de germinación de esporas (S_{max}) cuando $t \rightarrow \infty$ (en %) o la producción máxima de biomasa (X_{max} mg/mL) cuando $\frac{dy}{dt} = 0$, y c es la tasa específica de germinación (k en h^{-1}) cuando $S \ll S_{max}$ o la tasa específica de crecimiento de biomasa (μ_{max} en h^{-1}) cuando $X \ll X_{max}$.

La evaluación del crecimiento de la bacteria *E.coli* se llevó a cabo en 7 mL de medio nutritivo en tubos de ensaye, con una concentración de células inoculadas de 1×10^7 ufc/mL. A los tubos se les agregó 0.02 g de las muestras del textil tratado así como un control comercial (gasa comercial), textil de celulosa crudo (sin ningún tratamiento), y se dejó un tubo de ensaye con medio de cultivo e inoculado, pero sin textil, como blanco; todos se incubaron a 37°C y se agitaron a 100 rpm. Fueron tomadas muestras por duplicado cada 4 horas hasta un tiempo final de 43 h. Cada muestra se le realizaron diluciones decimales en

solución salina (0.09% p/v) y se inocularon en agar nutritivo, se incubaron a 37°C por 24 h con el fin de determinar cuenta de células viables (ufc/mL). De estas determinaciones experimentales se realizaron ajustes con un modelo exponencial usando el programa Origin 7.0 SR0, con base en la ecuación 1, descrita en el punto 8.1.3 del capítulo anterior.

$$y(t) = ae^{(bt)} \quad (1)$$

donde y es el número de células (X_t en ufc/mL) a determinado tiempo, a es el valor inicial (X_0 en ufc/mL), b es la tasa específica de crecimiento (μ_{\max} en h^{-1}). El porcentaje de inhibición (%I) provocado por el textil tratado sobre la bacteria, fue calculado considerando el número de células en el testigo (medio inoculado sin textil) comparado con el número de células de cada textil tratado, usando la siguiente ecuación 4.

$$\%I = \frac{(ufc / mL_{testigo} - ufc / mL_{muestra})}{ufc / mL_{testigo}} \times 100 \quad (4)$$

9.2 Resultados y discusión

9.2.1 Preparación y caracterización de los textiles funcionalizados

Los procedimientos químicos no-tóxicos realizados para la funcionalización de celulosa, con la finalidad de brindarle propiedades antimicrobianas por la adición de quitosano, fueron efectivos, pues las determinaciones de análisis elemental, los resultados obtenidos con el método de ninhidrina y los valores obtenidos del cálculo del biopolímero adicionado a la celulosa (CP), indicaron que, aún después de los lavados con jabón y ácido acético, hubo nitrógeno del quitosano (Tabla 9). Así se determinó con análisis elemental desde 6.78 ± 0 . hasta 24.68 ± 6.3 mg de quitosano/g de textil y con el método colorimétrico con ninhidrina desde 4.6 ± 0.47 hasta 32.5 ± 0.26 mg de quitosano/g de textil. La concentración de quitosano aumentó notablemente cuando la radiación con luz UV fue aplicado a las fibras de celulosa. El uso del catalizador, NaH_2PO_4 , incrementó los valores de CP y la concentración de quitosano; sin embargo, con mayores cantidades del fosfato de sodio no se entrecruzó más quitosano con el textil de celulosa, ni aún cuando se incrementó

en relación 1:1 con el agente entrecruzante; lo cual puede deberse a un posible entrecruzamiento entre el mismo quitosano y no con la celulosa, (muestras 13 a 16, Tabla 9), Figura 10. No obstante, debe hacerse notar que, usando la misma relación entre el AC y el NaH_2PO_4 , la cantidad de quitosano determinada por análisis elemental fue de entre 4 y 6 mg de quitosano/g de textil, y con la técnica de ninhidrina se obtuvo casi la mitad del valor. Esto indica que la concentración de grupos amino libres disminuyó, lo que indica una posible reacción de transamidación del quitosano.

QuickTime™ and a
decompressor
are needed to see this picture.

Fig. 10. Esquema del mecanismo de reacción de esterificación en presencia de fosfato de sodio, ácido cítrico, quitosano y celulosa.

El análisis con la ninhidrina fue basado en la reacción de los grupos amino libres disponibles del quitosano, los cuales producen un compuesto de color púrpura, el cual fue reportado por Curotto *et al* (1993). Nuestros resultados muestran que la esterificación del quitosano con la celulosa y el ácido cítrico se llevó a cabo sobre el grupo hidroxilo del carbono 6 del quitosano, dejando libre el grupo amino responsable de la actividad antimicrobiana del quitosano entrecruzado con el textil de celulosa.

Las diferencias entre los resultados obtenidos con las determinaciones por análisis elemental y por ninhidrina pueden ser atribuidas a factores implicados en la técnica, tales como la F_A , el GA del mismo y el pH del medio (Prochazkova *et al*, 1999).

Cuando se usó el ácido acético como disolvente, se obtuvo la menor incorporación de quitosano (6.78 hasta un máximo de 7.75 mg de quitosano/g de textil) debido a una posible competencia entre los grupos carboxilos del ácido acético y los del ácido cítrico por los

grupos alcohol del polisacárido, lo cual puede llegar a favorecer una acetilación en lugar de la esterificación buscada. Es notable la diferencia de estos valores con los resultados obtenidos en el lote en donde se usó el AC como disolvente y entrecruzante junto con el catalizador (NaH_2PO_4), pues el contenido de quitosano fue hasta de 16.53mg de quitosano/g de textil.

Tabla 9. Contenido de quitosano en textiles de celulosa funcionalizada^a.

Muestra	Tratamiento	CP ^b (%)	Análisis elemental (mg de quitosano/g de textil)	Método con ninhidrina (mg de quitosano/g de textil)
1	4%AC-AA	0.68	6.78 ± 0.94	4.61 ± 0.47
2	8%AC-AA	0.69	6.93 ± 0.20	8.15 ± 0.66
3	12%AC-AA	0.77	7.75 ± 0.48	5.73 ± 0.30
4	4%AC	0.64	6.45 ± 0.09	8.44 ± 0.75
5	4%AC – 2.3% NaH_2PO_4	1.65	16.53 ± 5.93	15.63 ± 2.18
6	8% AC- 2.3% NaH_2PO_4	1.31	13.07 ± 0.38	19.05 ± 0.59
7	12%AC- 2.3% NaH_2PO_4	1.20	12.02 ± 0.94	14.77 ± 1.53
8	4%AC- NaH_2PO_4 -4hUV	2.68	26.81 ± 0.05	22.01 ± 0.54
9	4%AC- NaH_2PO_4 -8hUV	2.72	27.19 ± 0.42	23.46 ± 2.84
10	4%AC- NaH_2PO_4 -20hUV	2.27	22.67 ± 0.12	23.55 ± 1.88
11	8%AC - NaH_2PO_4 -8hUV	1.61	16.07 ± 1.51	11.59 ± 0.96
12	12%AC- NaH_2PO_4 -8hUV	1.50	15.02 ± 1.09	16.19 ± 0.77
13	4%AC -9.2% NaH_2PO_4	1.20	12.02 ± 0.74	10.71 ± 0.16
14	4%AC -18.4% NaH_2PO_4	1.07	10.75 ± 0.50	10.33 ± 1.13
15	8%AC-4.6% NaH_2PO_4	0.66	4.59 ± 0.34	2.91 ± 0.29
16	12%AC-6.9% NaH_2PO_4	0.64	6.72 ± 0.02	3.36 ± 0.15
C1	4%AC-2.3% NaH_2PO_4	0.66	7.95 ± 0.41	8.47 ± 1.21
C2	4%AC-2.3% NaH_2PO_4	0.67	7.66 ± 0.09	9.63 ± 0.59

^aLos resultados presentados son los promedios de 3 determinaciones y su desviación estándar.

^bPolímero adicionado quitosano-celulosa, calculado de acuerdo a la Ec. 2.

Se observó un incremento en la cantidad de quitosano incorporado cuando se usaron lienzos de celulosa irradiados previamente con luz UV, logrando hasta 27.19 mg de quitosano/g de textil, pero no hubo diferencia en la cantidad de quitosano incorporado con el tiempo de irradiación. Esto se debe a los cambios en la polaridad de la superficie de la celulosa resultantes de la foto-oxidación causada por la luz UV, así como por la foto-

destrucción de enlaces glucosídicos y anillos, dejando grupos carboxilos reactivos (Sionkowska *et al*, 2006).

El entrecruzamiento de los quitooligosacáridos con la celulosa fue también efectivo, pues se logró la incorporación de 8 mg de COS/g de textil en ambos lotes de oligosacáridos (por análisis elemental) o hasta 9.63 mg de COS/g de textil (por el método de ninhidrina).

Se analizaron con el microscopio electrónico de barrido, las muestras que presentaron el mayor contenido de quitosano (Figuras 11a-11d), en donde es fácil observar los cambios físicos sufridos por el textil de celulosa al ser expuesto a la radiación con luz ultravioleta y se evidencia la presencia del quitosano como un velo que recubre al textil, en contraste con la imagen del control (Fig.11c). Cabe señalar que las micrográficas fueron tomadas después de los lavados a las muestras tratadas, con lo que se confirma la fijación del quitosano.

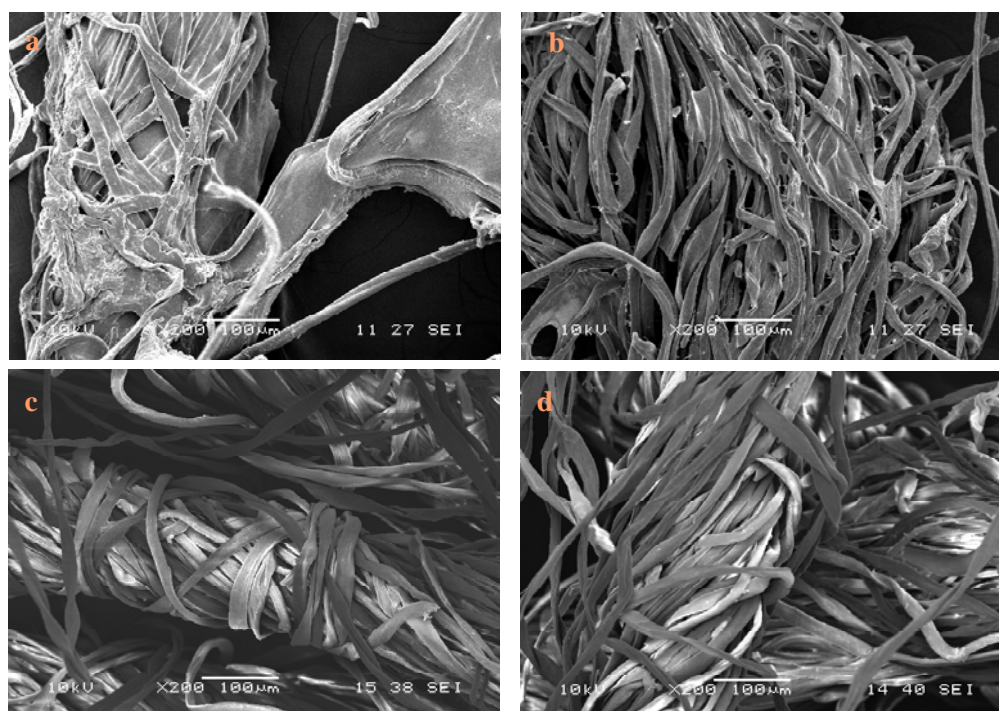


Fig. 11. Micrográficas por SEM, de a)muestra tratada con quitosano al 1.5% p/v en ácido cítrico al 4% p/v con NaH_2PO_4 al 2.3% p/v, b) muestra tratada con quitosano al 1.5% p/v en ácido cítrico al 4% p/v con NaH_2PO_4 al 2.3% p/v y 8h de irradiación con luz UV, c)celulosa no irradiada y d)celulosa irradiada con luz UV por 8h.

Del análisis por espectrofotometría de infrarrojo (FTIR) de las muestras tomadas durante cada una de las etapas del tratamiento para la funcionalización de los lienzos de celulosa, previamente irradiados con luz UV, se presentan los resultados en la Figura 12. En las muestras con pretratamiento térmico a 70°C (Fig.11, trazo o línea 1 y 2) y durante el curado a 130°C se observa la banda vibracional correspondiente al enlace éster (C=O) a los 1723.5 cm⁻¹, lo que demuestra que durante estas etapas se lleva a cabo la reacción de esterificación con la que se logra la fijación del quitosano en la celulosa. Se observa que conforme se cambia de etapa (Figs.12, trazo 2-4) la intensidad de la banda disminuye, debido a que se va retirando el exceso de solución conforme se fueron muestreando cada una de las etapas. Es visible un pico en la zona de 1642.2 cm⁻¹ correspondiente a la amida secundaria presente en el quitosano, así como es visible la banda vibracional a los 1533.48 cm⁻¹ correspondiente al grupo amino también presente por la fijación del quitosano en la celulosa.

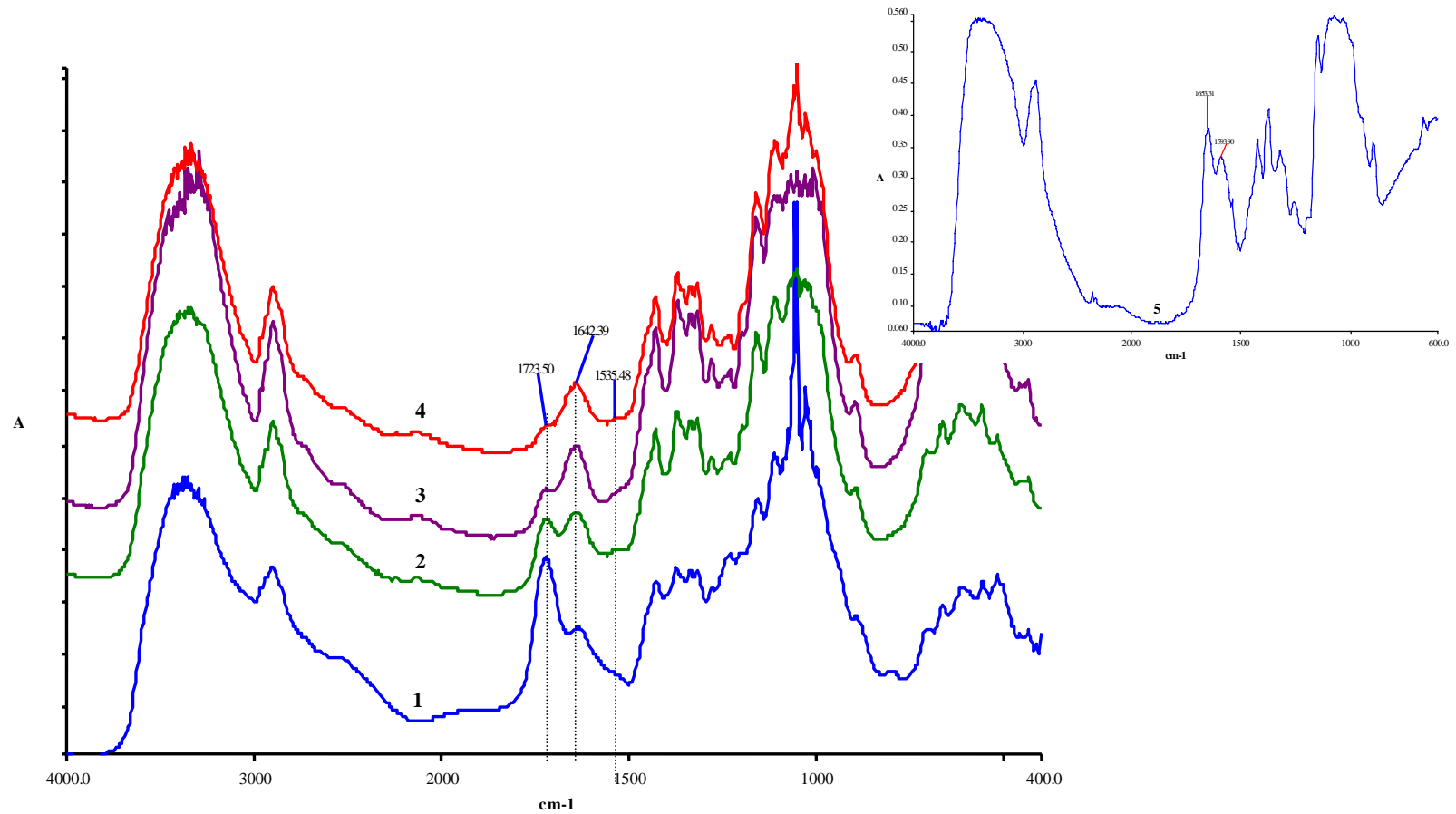


Fig. 12. FTIR de: **1)** Pretratamiento térmico a 70°C/5min, **2)** Curado en seco a 130°C/3min, **3)** Después del lavado con jabón, **4)** Después del lavado con ácido acético; **5)** FTIR del quitosano usado para la funcionalización.

Mediante termogravimetría, TGA, se obtuvieron los termogramas que se presentan en la Figura 13, correspondientes al algodón crudo, al quitosano y a las muestras funcionalizadas con mayor contenido de quitosano; en éstos se observa que la pérdida de peso de la muestra de quitosano (trazo a) comienza cerca de los 300°C, temperatura similar a la reportada por Cardenas & Miranda (2004) para un quitosano con peso molecular y grado de acetilación similar al aquí usado; el textil de celulosa presentó un cambio de peso drástico alrededor de los 350°C (trazo b); este valor está dentro del intervalo de 243°C-360°C que corresponde a la descomposición de α -celulosa (Sharma, 1996); mientras que la muestra 9 de la Tabla 9 presentó un descenso drástico en la pérdida de peso alrededor de los 370°C, indicando que ésta es térmicamente más estable que la celulosa no funcionalizada, por lo tanto la celulosa inicial se logró funcionalizar por medio de la esterificación con el quitosano por medio del proceso no-tóxico aquí desarrollado.

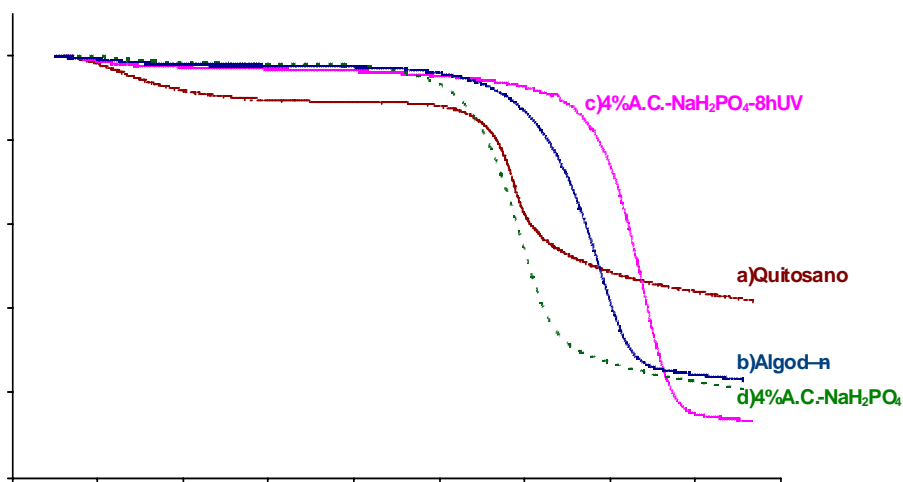


Fig. 13. Termogramas de: a) quitosano, b) textil de algodón crudo, c) muestra irradiada con UV funcionalizada con quitosano, d) muestra funcionalizada con quitosano.

Con las determinaciones de los ángulos de contacto se observó que tanto la celulosa cruda como la celulosa irradiada con UV, así como las muestras funcionalizadas con el

quitosano son totalmente hidrofóbicas al igual que el Teflón usado como control, como está reportado (Feng *et al*, 2006) presentaron un ángulo de contacto con agua de más de 90°, (Tabla 10, Figura 14). Esto indica que la cantidad de quitosano entrecruzado no fue lo suficiente como para cambiar la hidrofobicidad de la matriz, que en este caso es el tejido de celulosa cruda.

Tabla 10. Resultados de la determinación del ángulo de contacto^a.

Muestra	Ángulo(°)
Algodón	104.08 ± 15.5
Algodón Irradiado	123.15 ± 1.8
4%AC-NaH ₂ PO ₄	135.7 ± 0.6
4%AC-NaH ₂ PO ₄ -8hUV	122.79 ± 9.9
Teflón	125.5 ± 0.8

^aResultados del promedio de 3 determinaciones y sus desviaciones estándar.

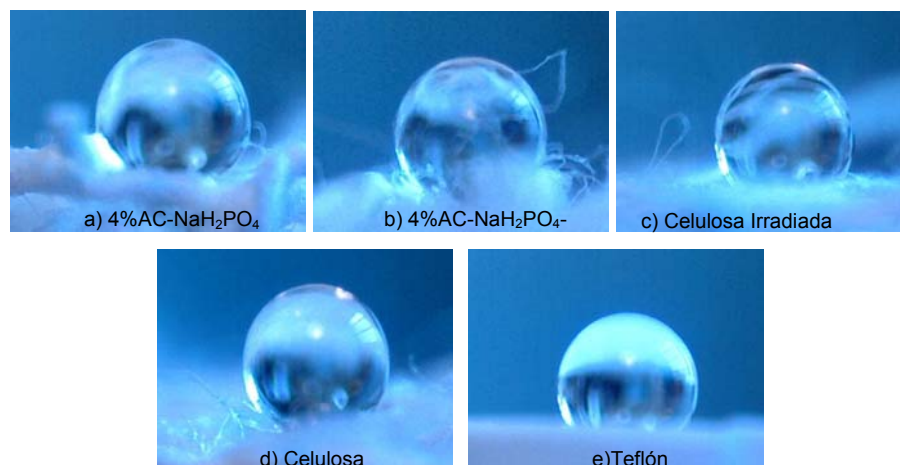


Fig. 14. Determinación de ángulos de contacto en: a) y b) tratamientos funcionalizados con quitosano, c y d) celulosa y e) Teflón como control.

9.2.2 Determinación de crecimiento de biomasa y tasa de germinación por efecto del textil funcionalizado.

Con los tratamientos realizados con diferentes concentraciones de ácido cítrico sobre soluciones de quitosano disuelto en ácido acético al 0.1M, el máximo de producción de biomasa de *P. chrysogenum* fue de 6 mg de biomasa/mL de medio, mientras que con el algodón crudo el máximo fue de 10 mg de biomasa/mL de medio. Inhibición del 40%.

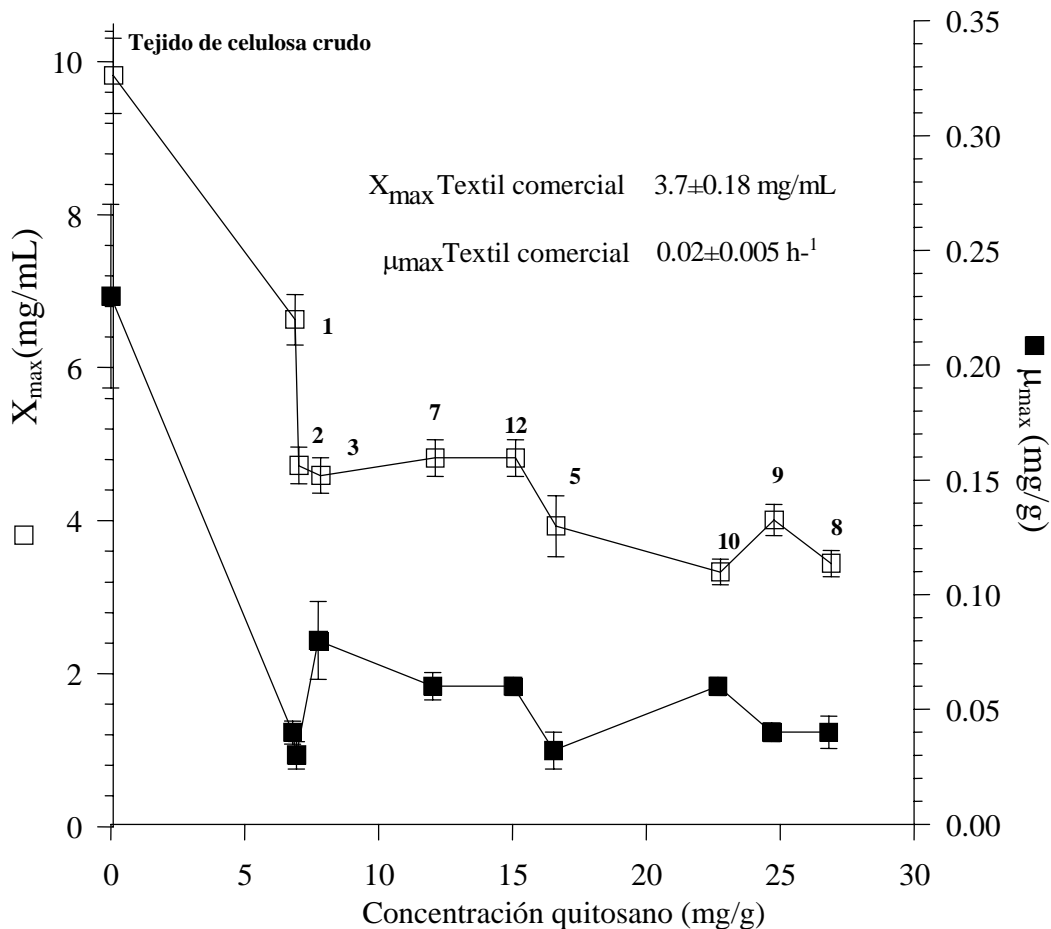


Fig. 15. Tasas específicas de crecimiento, μ_{\max} (■) y máxima producción de biomasa, X_{\max} (□) de *P. chrysogenum* determinada con el control (textil de celulosa crudo), textil comercial (gasa) y varios tratamientos de celulosa entrecruzada con quitosano muestras 1-3, 5-12, Tabla 9. Cada punto de la gráfica fue estimado con el modelo logístico con los datos experimentales del crecimiento de biomasa.

En cambio con los tratamientos de mayor contenido de quitosano, muestras 5 y 9 (Tabla 9), inhibieron al *P. chrysogenum* tanto como el control comercial (sales cuaternarias de amonio), en las que se obtuvo hasta 3.77 mg de biomasa/mL de medio y 3.44 mg de

biomasa/mL de medio, respectivamente. Esto representó menos del 66% de la biomasa de *P. chrysogenum* obtenida con el textil de celulosa crudo. En la Figura 15 se presentan los resultados de las tasas específicas de crecimiento (μ_{max}) y máxima biomasa (X_{max}) de *P. chrysogenum* determinada con textil de celulosa crudo, textil de gasa comercial y varios de los textiles funcionalizados con quitosano obtenidos.

Los resultados sobre la germinación de esporas de los mejores tratamientos con AC al 4% p/v se presenta en la Figura 16. En esta figura se observa inhibición del 100% con la muestra 5 durante las 6 primeras horas de incubación y no alcanza más del 50% de esporas germinadas a las 24 horas; con la muestra 9, en cambio, se observa que se tiene menos del 5% de esporas germinadas hasta después de 12 h de incubación, y no alcanzó un máximo de 60% de esporas germinadas sino hasta las 24 h de incubación. La inhibición de la germinación de esporas en ésta muestra fue mejor que con el control comercial, pues con ésta la germinación se inició cerca de 4 horas antes que con la muestra 9 (Tabla 9); la germinación hasta las 24 h de incubación fue similar a la obtenida con las mejores muestras aquí funcionalizadas.

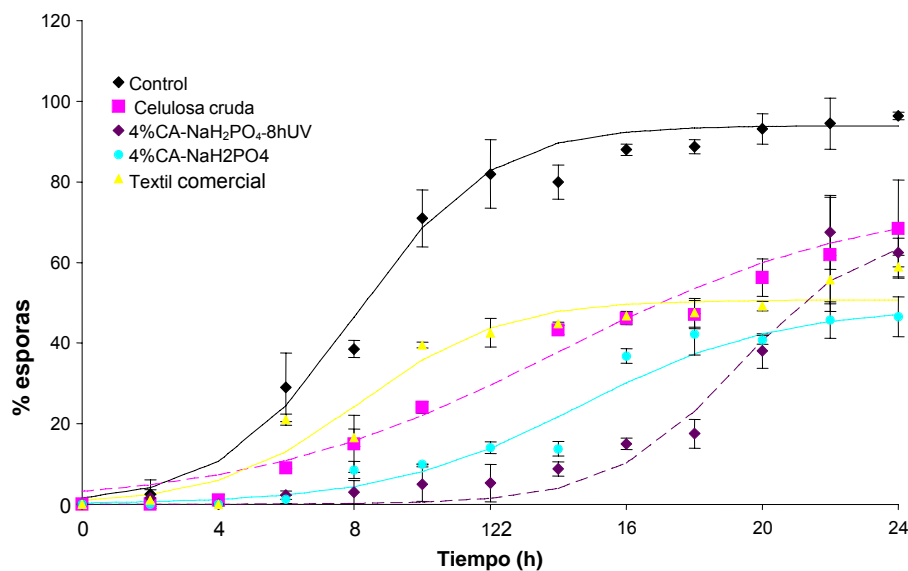


Fig.16. Porcentaje de germinación de esporas de *P. chrysogenum* determinado para: celulosa cruda quitosano en 4 p/v% de AC y NaH₂PO₄; quitosano en 4 p/v% de AC y NaH₂PO₄ y 8h UV; textil comercial con propiedades antimicrobianas.

La tasa de germinación de esporas (k) de los textiles antimicrobianos aquí obtenidos con la gasa comercial fue de 0.48 h^{-1} y el máximo porcentaje de esporas germinadas (S_{\max}) fue de $100 \pm 4.91\%$, mientras que con el textil de celulosa funcionalizado con la clave 9 en la tabla 5 se tuvo una k de 0.34 h^{-1} y una S_{\max} de $60 \pm 7.53\%$, como se puede observar en la Figura 17.

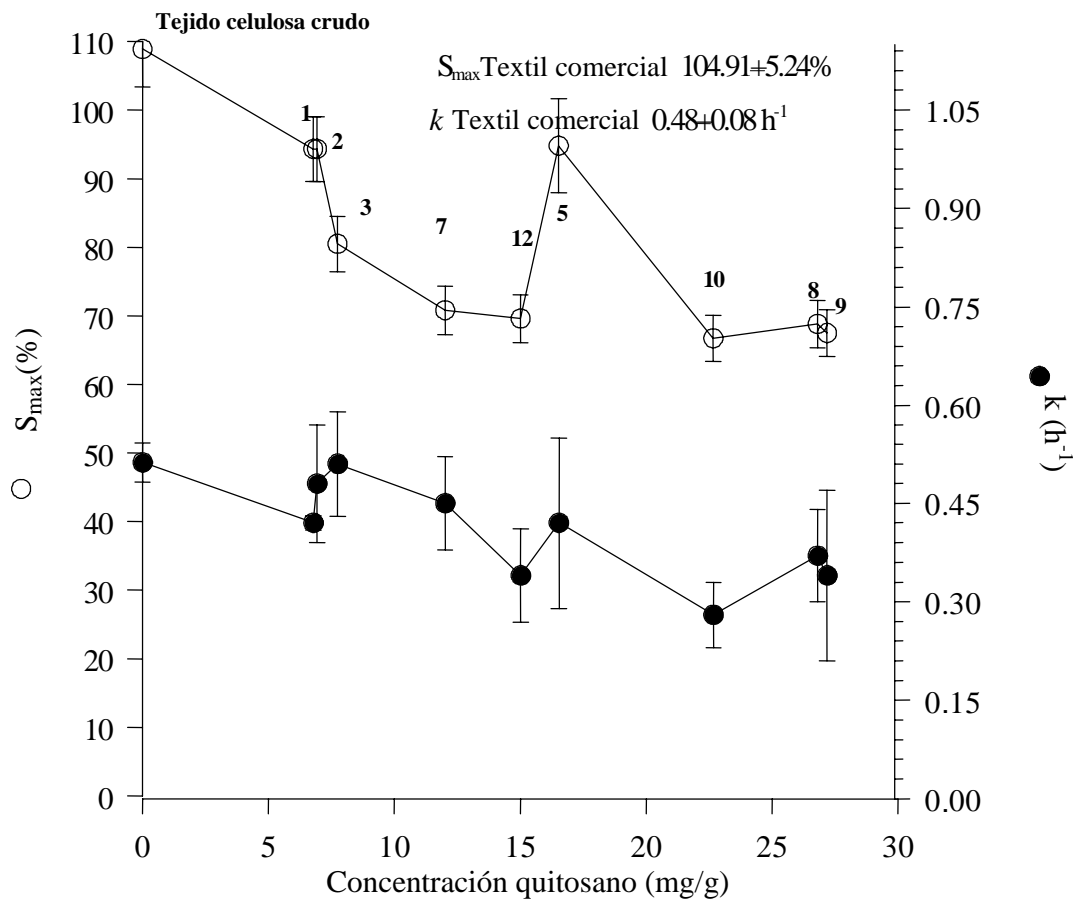


Fig. 17. Tasas específicas de germinación, k (●), y máximo porcentaje de esporas germinadas, S_{\max} (○), de *P. chrysogenum* determinada con textil de celulosa crudo, textil comercial (gasa) y varios textiles funcionalizados con quitosano 1-3, 5-12 en la Tabla 9. Cada punto del gráfico fue determinado con base en el modelo logístico con los datos de cada muestra de la germinación de esporas.

La inhibición del hongo durante la germinación y durante el crecimiento apical fue directamente proporcional a la cantidad de quitosano incorporado y entrecruzado con la celulosa (Fig. 15 y 17). Cabe mencionar que los textiles funcionalizados probados contra los

microorganismos fueron previamente lavados, lo que indica que ocurrió una formación de enlaces covalentes entre el quitosano y la celulosa.

La inhibición de la bacteria *E. coli*, se llevó a cabo con los mejores tratamientos aquí obtenidos con base en su mayor contenido de quitosano, así como con los controles (Fig.18). En la gráfica es apreciable que los tratamientos descritos como los mejores en cuanto a la inhibición de *P. chrysogenum* (muestra 5 y 9, Tabla 9), fueron también efectivos para tener un 100% de inhibición de *E. coli*, sin una diferencia significativa con respecto al control, la gasa comercial, aún hasta después de transcurridas 44 h de incubación; pero es muy notoria la inhibición en relación con el control de textil de celulosa cruda, sin tratamiento.

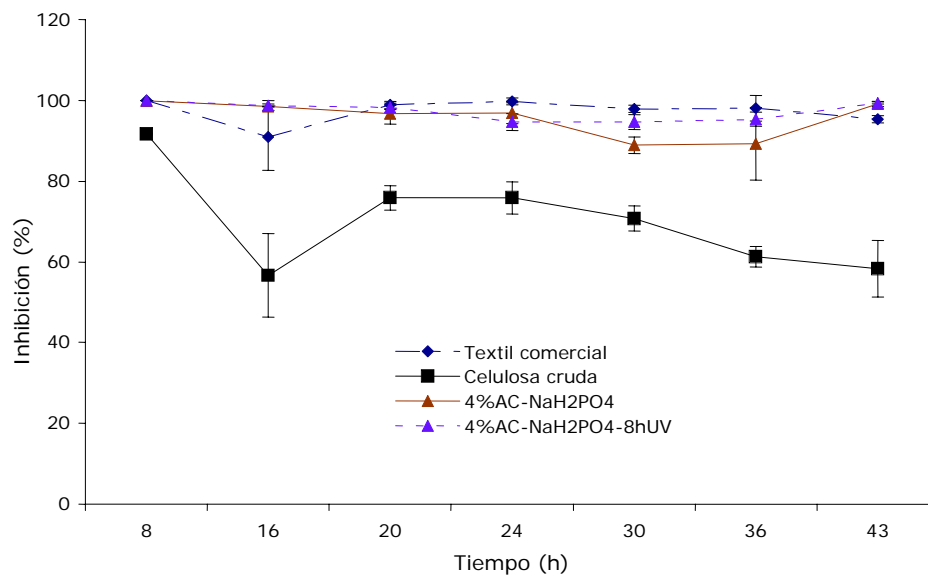


Fig. 18. Porcentaje de Inhibición de *E. coli* determinado para: celulosa cruda quitosano en 4p/v% de AC y NaH₂PO₄; quitosano en 4p/v% de AC y NaH₂PO₄ y 8h UV; textil comercial con propiedades antimicrobianas.

La tasa específica de crecimiento de la bacteria (μ) con los textiles funcionalizados con el mayor contenido de quitosano, así como del textil de celulosa crudo y de la gasa comercial se presentan en la Tabla 11, las cuales fueron obtenidas con el ajuste de los datos con el modelo exponencial, en los que se puede observar que hubo una diferencia significativa de aproximadamente 0.3 h^{-1} entre el control y las muestras funcionalizadas.

Tabla 11. Tasas específicas de crecimiento (μ)^a para *E. coli* obtenidas con los mejores tratamientos de textiles de celulosa funcionalizados.

Clave muestra	Tratamiento	μ (h ⁻¹)	R ²
	Textil de celulosa crudo	0.42±0.05	0.986
	Gasa comercial	0.10±0.03	0.809
5	4%AC-2.3%NaH ₂ PO ₄	0.10±0.04	0.843
9	4%AC-2.3%NaH ₂ PO ₄ - 8hUV	0.10±0.02	0.874

^aEstimada con un modelo exponencial con los datos de ufc/mL, usando la Ec.3

Es importante mencionar que la gasa comercial es tratada con sales cuaternarias de amonio como N-alquil dimetil benzil cloruro de amonio con la finalidad de inhibir el crecimiento de bacterias por la inactivación de enzimas, desnaturalización de proteínas esenciales de los microorganismos o por el rompimiento de la pared celular; mientras que el mecanismo de inhibición del quitosano reside en su interacción por cargas con la pared celular, impidiendo el paso de nutrientes causando eventualmente su muerte (Chan *et al*, 2001).

De las muestras funcionalizadas con los quitoooligosacáridos, C1 y C2, no se obtuvo inhibición de ninguno de los microorganismos, *P. chrysogenum* ni *E. coli* usados en esta parte de la investigación a pesar de que el contenido de quitoooligosacáridos es similar a la cantidad de quitosano detectado en los tratamientos en los que se utilizó ácido acético como disolvente para el quitosano, de cerca de 6 mg de quitosano/g de textil. Pero, al igual que los tratamientos con quitosano (muestras 1-3, Tabla 9), la cantidad de quitosano entrecruzado no fue suficiente para lograr un efecto inhibitorio considerable sobre el hongo, *P.chrysogenum*.

9.3. Conclusiones

Los tratamientos de este trabajo, además de no ser tóxicos, son eficientes para la fijación del quitosano en el textil de algodón. Después de ser lavado con jabón y con un disolvente muy común para el quitosano, el ácido acético acuoso, presentó una notable inhibición de microorganismos indeseables como el hongo *P. chrysogenum* y la bacteria *E. coli*; esta inhibición fue semejante a la obtenida con la gasa comercial, la cual contiene un tratamiento químico antimicrobiano. El uso de textil de celulosa previamente irradiada con luz

UV incrementó la cantidad de quitosano entrecruzado. La esterificación de la celulosa con el quitosano se llevó a cabo en el carbono 6 del quitosano, dejando libre el grupo amino de este, del cual dependen las propiedades antimicrobianas de éste.

10. FUNCIONALIZACIÓN DE TEXTIL DE CELULOSA CON MICROCÁPSULAS DE QUITOSANO CON ACEITE ESENCIAL DE TORONJA.

10.1. Materiales y Métodos

10.1.1 Reactivos

Quitosano marca Heppe, Gmb (Alemania) usado tal cual fue recibido. Ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) y fosfato de sodio (NaH_2PO_4), marca JTBaker. Aceite esencial de toronja, obtenido en Droguería Cosmopolita (México) y usado sin purificación posterior. Tween-20, marca Hycel (México). Hidroxi-propil-metil celulosa 2910 HE 50BV, fue una donación de Celanese (México) y maltodextrina DE-10, marca Maltadex™10 fue obtenida con Complementos Alimenticios, S.A de C.V. (México). El textil de celulosa cruda fue donado por casa Miyako (México).

10.1.2 Microorganismos.

Escherichia coli (NRRLB 14218, de la colección USDA ARS) la cual fue cultivada y mantenida a 4°C en agar nutritivo (Bioxon, E.U.A) hasta que fue usada. *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990 de la American Type Culture Collection Manassas, E.U.A) fue cultivada y mantenida a 4°C en agar de soya tripticaseina (Bioxon, E.U.A).

10.1.3 Preparación de microcápsulas de quitosano.

El aceite esencial de toronja (AET) fue homogenizado en una solución acuosa al 15% p/v (con base en las pruebas de inhibición del puro AET, anexo 4), con Tween-20 (0.35% p/v). Esa solución fue agregada gota a gota en una solución acuosa de quitosano al 2% p/v con ácido cítrico al 4% p/v. La mezcla fue agitada hasta obtener una emulsión aceite-en-

agua (emulsión A) con un pH de 2.98. El contenido de sólidos de la que llamamos emulsión A fue incrementado por la adición de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) al 7.5% p/v, lo que generó lo que llamamos emulsión B. Por otra parte, se agregó maltodextrina (MD) al 20% p/v a la emulsión A, dando lugar a la formación de la emulsión C. Estas tres emulsiones, A, B y C, fueron homogenizadas con un Ultra Turrax Ika 25 (marca Janke and Kunkel GmbH and Co., Alemania) agitando a 20,000 rpm durante 7 min. Las emulsiones fueron secadas por aspersión en un minisecador Büchi 190 (marca Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza) con un inyector de aspersión a una temperatura de entrada de $170\pm 5^{\circ}\text{C}$, y una temperatura de salida de $70\pm 5^{\circ}\text{C}$ y a presión de 400 mm/H₂O.

10.1.4 Entrecruzamiento de las microcápsulas de quitosano en textil de celulosa.

La funcionalización de textiles de celulosa fue llevada a cabo siguiendo la técnica previamente descrita en el punto 9.1.3. Textiles de celulosa previamente irradiada con luz Ultra Violeta (UVGL-58, Ultra-Violet Products, USA) durante 8 h a una longitud de onda de 254 nm, fueron sumergidos por separado en cada una de las emulsiones, A, B y C; después se agregó fosfato de sodio como catalizador para la reacción de esterificación a una concentración de 2.3% p/v a cada una de las emulsiones, y se cambió el pH de 2.9 a 3.18. Las mezclas con el textil de celulosa fueron calentadas a $70^{\circ}\text{C}/5\text{min}$ bajo agitación, después el textil fue retirado de cada una de las emulsiones, y curado en seco en un horno a 130°C por 3 min; se procedió al lavado con jabón, seguido de un lavado con ácido acético (0.1M) y un enjuague con agua destilada; se dejaron secar por la noche y los textiles resultantes se nombraron M1, M2 y M3 correspondientes a la emulsión A, B y C, respectivamente.

10.1.5 Determinación de los compuestos volátiles del AET en las muestras funcionalizadas.

Se realizaron análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) del "head space" de viales de vidrio de 10 mL que contenían 5 mL del aceite esencial de toronja (AET) o 5 mL de las emulsiones; para las muestras obtenidas del secado por aspersión y los textiles funcionalizados se emplearon viales de 5 mL con 50 mg o 1 g, respectivamente. Dichos frascos fueron sellados con tapones de látex seguidos con tapones

de aluminio ajustados al vial; éstos fueron sonicados durante 20 min y mantenidos en un baño a 40°C, para la liberación completa de los compuestos volátiles. El contenido de AET no encapsulado en las emulsiones fue determinado también por análisis de GC-MS, tomando muestra del “head space” de las emulsiones sin sonicar. Se inyectaron 250 µL de los volátiles atrapados en el espacio de cabeza con una jeringa, en el cromatografo (Hewlett Packard HP 6890, E.U.A) el cual está unido a un detector de masas (Hewlett Packard, E.U.A) con el modo de ionización de electrón por impacto a 70eV ($m/z=29-550$). Los compuestos volátiles del AET se separaron en una columna capilar HP-5 para espectrometría de masas (5% fenil metil siloxano, 30 m de largo, 0.25 mm d.i., 0.25 µm de espesor de película). La temperatura fue programada de 150 °C/10 min con un rampeo de hasta 220°C con un aumento de 5 °C/min durante 10 min. Se usó helio como gas acarreador con una velocidad lineal de 29 cm/s. Se usó un modo de fractura o separación con una relación 25:1 y una temperatura de inyección de 250°C. El contenido de cada uno de los componentes del AET fue expresado en unidades arbitrarias (au) basado en el total de iones de los picos detectados más relevantes. Los componentes fueron identificados por la comparación de los espectros de masas obtenidos con aquellos de la librería electrónica NIST05a (Agilent, E.U.A).

10.1.6 Determinación del contenido de quitosano en los textiles funcionalizados.

El contenido de nitrógeno de los textiles funcionalizados fue determinado por análisis elemental en un Perkin Elmer serie 2400 (E.U.A). El nitrógeno de los grupo amino libres del quitosano entrecruzado en el textil fue también determinado por la técnica colorimétrica con ninhidrina reportada por Sun *et al* (2004), como se describió en el punto 9.1.4. de este trabajo. Estas determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

10.1.7 Morfología de las microcápsulas y de los textiles funcionalizados.

Las muestras de los textiles, así como de las microcápsulas del secado por aspersión fueron cubiertas con carbón y oro antes de poder ser observadas en el microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900 LV, Japón). También se observaron las muestras del textil funcionalizado usadas en la determinación de la inhibición de los microorganismos,

después de estar en contacto con el microorganismo en el medio de cultivo (incubadas a 37°C por 54 h) y éstas fueron primero fijadas con glutaraldehído, seguido de un lavado con buffer de fosfatos (pH 7) para retirar el glutaraldehído, seguido de la adición de tetraóxido de osmio, OsO₄, posteriormente se procedió a deshidratarlas con etanol y posteriormente se secaron con CO₂ al punto crítico. El diámetro promedio de las partículas obtenidas por el secado por aspersión, así como el de las microcápsulas fijadas en la tela funcionalizada fue determinado con la ayuda del programa ImageJ versión 1.41o (National Institutes of Health, E.U.A.).

10.1.8 Determinación de la inhibición de microorganismos indeseables con los textiles funcionalizados.

La evaluación del crecimiento bacteriano se llevó a cabo inoculando 5 mL de medio nutritivo con suspensión de células de *E. coli* en tubos de ensaye con una concentración de 2×10^4 ufc/mL. Para la bacteria *S. epidermidis* se inocularon tubos de ensaye también con 5 mL de medio de soya tripticaseína, con una suspensión de células con una concentración de 3.8×10^5 ufc/mL. A los tubos ya inoculados se les adicionó 0.01 g de textil de celulosa crudo, sin tratamiento como blanco, o muestra del textil funcionalizado y se dejaron unos tubos inoculados a los cuales no se les agregó ningún textil, usado como control. Todos los tubos fueron incubados a 37°C y agitados a 70 rpm. Las muestras fueron colectadas por duplicado cada 4 h hasta un tiempo final de 54 h para *E. coli*, y cada 3 h hasta un tiempo final de 48 h para *S. epidermidis*. De todas las muestras colectadas se hicieron diluciones decimales en solución salina al 0.09% p/v e inoculadas en placas, ya fuese de medio nutritivo o de soya tripticaseína, según fuera necesario para la cepa; estas fueron incubadas a 37°C por 24 h para poder realizar una cuenta de bacterias viables (ufc/mL). Los datos experimentales del crecimiento de las bacterias fueron ajustados con un modelo exponencial, ecuación 1, descrita en el punto 8.2.2. de este trabajo.

10.1.9 Análisis estadístico del tamaño de las microcápsulas.

Se realizaron histogramas de la distribución del tamaño de partícula de las microcápsulas, determinado con los datos obtenidos con el programa ImageJ, siguiendo los principios de la estadística descriptiva reportada por Infante y Zarate (1986). Se contaron 150

partículas de las muestras del secado por aspersión y 50 partículas de las entrecruzadas en el textil de celulosa funcionalizada.

10.2. Resultados y Discusión

10.2.1 Preparación de las microcápsulas

De las observaciones por microscopía electrónica de barrido de las microcápsulas obtenidas por secado por aspersión de las emulsiones A, B y C, se obtuvieron algunas micrografías que se presentan en la Figura 19 (19a, 19b y 19c, respectivamente). Como se puede observar en éstas, hay diferencias en cuanto a su morfología, esto se debe a las diferentes concentraciones de sólidos empleadas en cada una de las emulsiones.

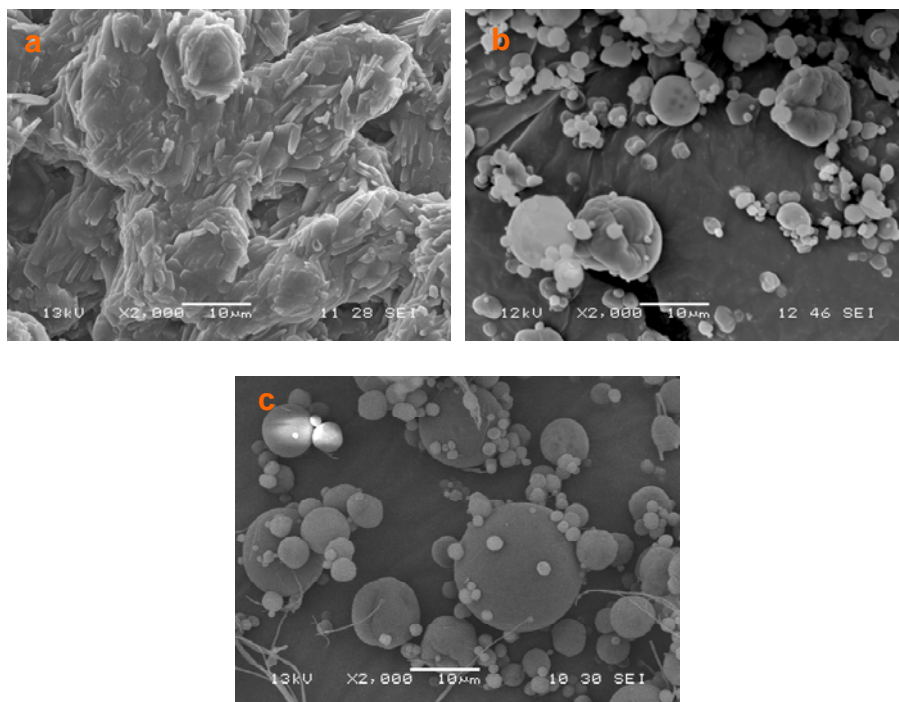


Fig. 19. Micrografías con microscopio electrónico de barrido de microcápsulas: **a)** Emulsión A, **b)** Emulsión B, **c)** Emulsión C.

Como se observa (Fig.19a) no fue exitosa la formación de microcápsulas con la emulsión A, mientras que con la emulsión B (Fig.19b) donde se usó una concentración total

de sólidos de 9.5% p/v (7.5% p/v de HPMC más 2% p/v de quitosano), las microcápsulas obtenidas muestran una morfología heterogénea; cuando se usó una concentración del 22% p/v (20% de MD más 2% p/v de quitosano) se obtuvieron microcápsulas perfectamente esféricas pero con un tamaño diverso (Fig. 19c).

La deformidad en las microcápsulas puede ser atribuida al contenido de sólidos usado; existen reportes en los que se observan microcápsulas amorfas, relativo a una cantidad insuficiente de sólidos para encapsular el aceite (Maji, 2007). La cantidad de sólidos debe ser suficiente para la encapsulación adecuada de las vesículas del aceite formadas en la emulsión. La textura superficial y la suavidad son dependientes de la concentración de sólidos en las emulsiones asperjadas y secadas con secador por aspersion. Esto se confirma con nuestros resultados, ya que, a mayor concentración de sólidos usada en la emulsión, se obtuvieron macropartículas esféricas y más homogéneas.

Cuando se usó HPMC 7.5% p/v, para incrementar el contenido de sólidos de la emulsión A, la emulsión obtenida (Emulsión B) resultó altamente viscosa, lo que impidió su uso para el tratamiento de funcionalización del textil de celulosa previamente irradiada con luz UV.

El análisis estadístico de la distribución de tamaño de las microcápsulas obtenidas por el secado por aspersion de la Emulsión B (Figura 20a), mostró que están dentro del orden de 0.1 μm a 20 μm ; las más numerosas oscilan entre 2 y 3 μm , seguidas por las de tamaño de 12 μm . Por otro lado, la mayoría de las microcápsulas obtenidas con la Emulsión C fueron de tamaño menor de 2.5 μm ; las más numerosas entre 0.01 y 1 μm , y aquellas de entre 0.5 y 2.5 μm (Figura 20b). Hubo algunas de mayor tamaño (5 y 20 μm).

Los cromatogramas obtenidos del análisis de la cromatografía de gases (GC) del aceite esencial de toronja (AET), así como la espectrometría de masas de cada pico obtenido por GC, el cual fue usado como control, se muestran en la figura 21a y 21b, respectivamente.

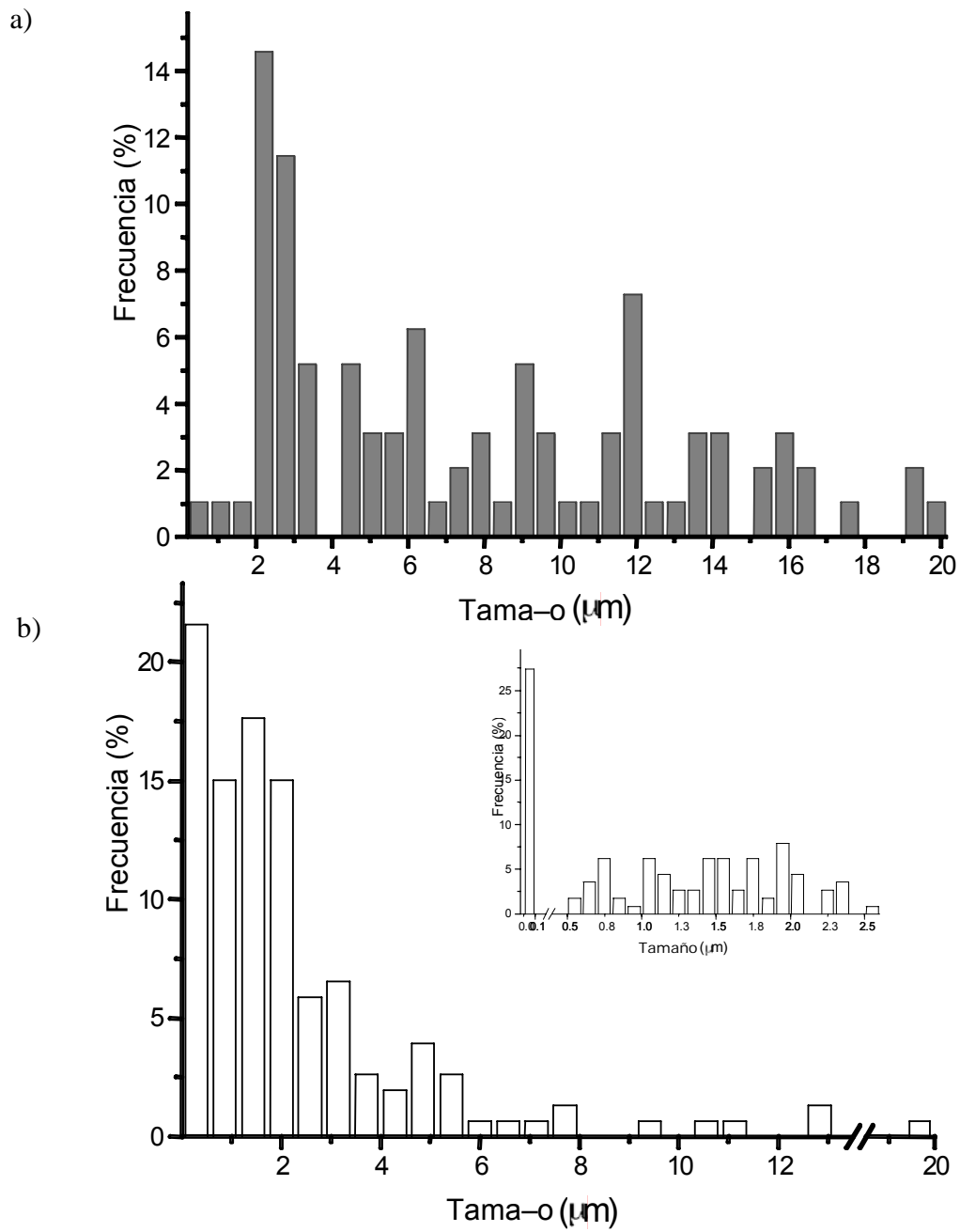


Fig. 20. Histogramas de la distribución del tamaño de partícula del secado por aspersion de: **a)** emulsión B; **b)** emulsión C.

Las concentraciones de los principales compuestos volátiles extraídos del “head space” de las muestras del AET, así como del AET microencapsulado en quitosano, quitosano-HPMC, quitosano-MD, están expresados en unidades arbitrarias (au) relacionadas al área de los picos obtenidos y se presentan en la Figura 22.

En los resultados se pudo observar que la concentración de ciertos compuestos del AET, disminuyeron en relación al control, puro AET, cuando se llevó a cabo el secado por aspersión, Figura 22. Cuando se secó por aspersión usando una baja concentración de sólidos (menos de 20% p/v, emulsión A y B), compuestos como el D-limoneno y el α -pineno fueron mantenidos a concentraciones bajas de entre 3.5×10^6 y 2.0×10^6 au, respectivamente, con la total desaparición del β -pineno; mientras que cuando se usó la MD, con un contenido de sólidos total de 22% p/v, el D-limoneno se mantuvo con una concentración de alrededor de 1.9×10^7 au.

Por otro lado, el contenido del AET en las emulsiones fue determinado con la finalidad de saber la concentración de los compuestos no encapsulados; el resultado mostró que a mayores cantidades de sólidos usados en la emulsión (emulsión C), menor fue la concentración de terpenos libres, esto corresponde a una mejor encapsulación del AET. Esto es relevante por las propiedades antimicrobianas finales del producto, pues el Limoneno, D-limoneno y α -pineno son los mayores componentes en los aceites de cítricos; los cuales han sido señalados como agentes antimicrobianos, pues restringen la reproducción celular por la inhibición de las autolisinas también llamadas N-acetilmuramoil-L-alanin amidasa, enzima responsables de romper el peptidoglicano presente en la pared celular para que se lleve a cabo el crecimiento o reproducción celular (Chaibi *et al*, 1997).

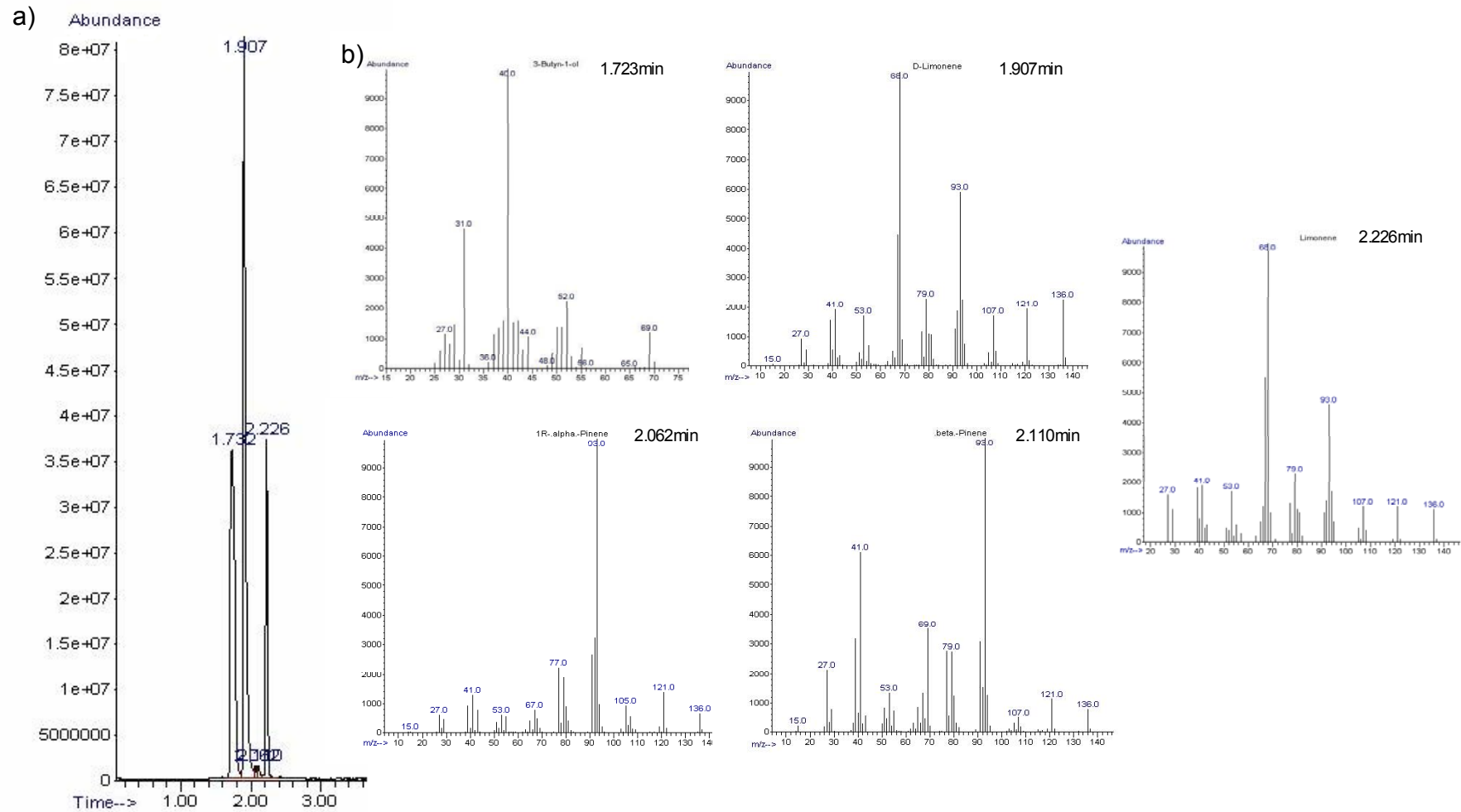


Fig. 21. a) Cromatograma de los compuestos volátiles obtenidos del espacio de cabeza de AET, **b)** Espectros de las masas de cada uno de los picos obtenidos por GC del AET, correspondientes a: 3-Butil-1-ol, D-Limoneno, α -pineno, β -pineno y Limoneno.

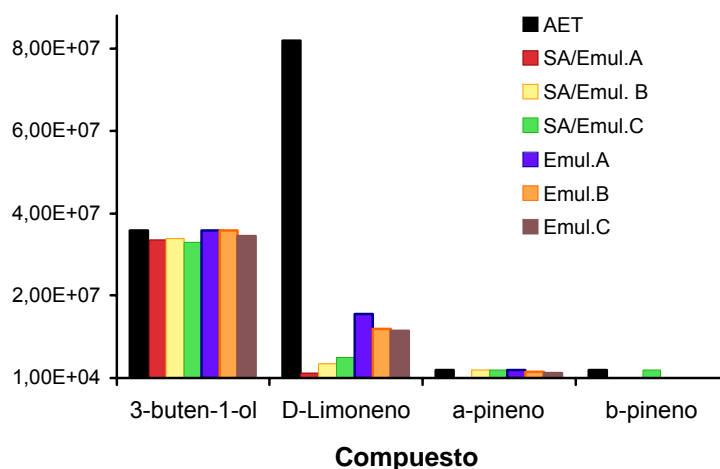


Fig. 22. Concentración de los compuestos volátiles obtenidos en el espacio de cabeza y caracterizados por GC-MS, del AET, de las muestras obtenidas del secado por aspersión de cada una de las emulsiones (SA), así como del espacio de cabeza de las emulsiones.

10.2.2 Entrecruzamiento de las microcápsulas de quitosano en el textil de celulosa

El resultado de la determinación del contenido de nitrógeno presente en el textil funcionalizado por ambos métodos, análisis elemental (CHN) y con ninhidrina. Se presenta en la Tabla 12. La máxima concentración de quitosano (21.77 mg de quitosano/g de textil) fue obtenido en la muestra M1, tratada con la emulsión A, lo cual se puede atribuir al uso de quitosano únicamente en la emulsión, el cual si mantiene microcápsulas como se observó por microscopía electrónica de barrido (SEM), Figura 23a, pero también formó velos o capas que recubrieron el textil como se observaron en el capítulo anterior (9.2.1, Fig. 11). Mientras que, cuando se usó quitosano-MD, emulsión C, muestra M3, se obtuvieron microcápsulas con una morfología más uniforme. Como se observó por SEM hay más microcápsulas y no es notable la presencia de velos de quitosano sobre la celulosa (Fig.23b); el contenido de quitosano fue menor que el de la muestra M1, casi 5mg de quitosano/g de textil de diferencia entre ambas muestras. Esto indica que el uso de quitosano solo, para microencapsular puede no ser tan eficiente como el uso de una mezcla de biopolímeros. Pero solo, puede ser efectivo para un proceso de funcionalización, ya que la cantidad de quitosano entrecruzado en forma de microcápsulas es similar a la obtenida cuando no se entrecuzaron

microcápsulas, sólo quitosano (punto 9.2.1, Tabla 9), cantidad suficiente para tener inhibición microbiana efectiva como se reportó en el capítulo anterior (punto 9.2.2).

Tabla 12. Contenido de quitosano presente en el textil funcionalizado^a.

Tratamiento	Análisis Elemental (mg de quitosano/g de textil)	Ninhidrina (mg de quitosano/g de textil)	Clave muestra
Emulsión A	21.77 ± 0.87	21.21 ± 1.85	M1
Emulsión B	16.98 ± 0.31	17.13 ± 0.65	M2
Emulsión C	16.08 ± 0.29	17.02 ± 0.67	M3

^aLos resultados son el promedio de 3 determinaciones y su desviación estándar.

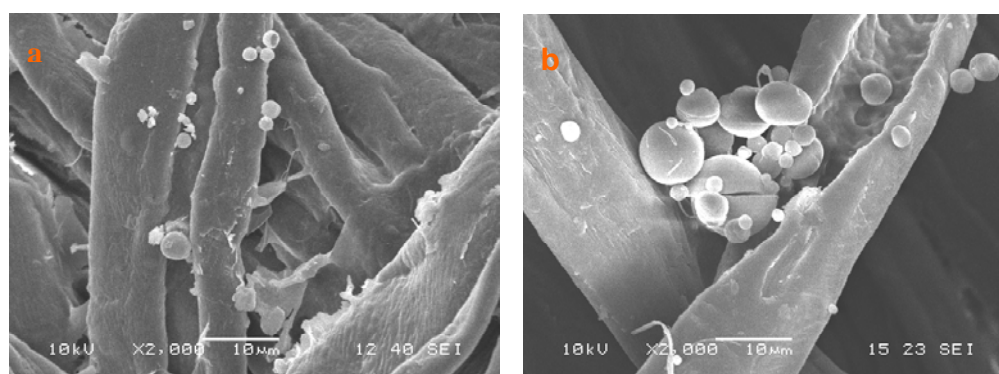


Fig. 23. Micrografías electrónicas de barrido: **a)** textil de celulosa funcionalizada M1, **b)** textil de celulosa funcionalizada M3.

En contraste con lo obtenido con las muestras M1 y M3, cuando se usó quitosano-HPMC, textil funcionalizado M2, la emulsión para el tratamiento fue sumamente viscosa, como resultado del aumento de la temperatura de la solución acuosa de HPMC, lo que a su vez provoca un aumento de las interacciones hidrofóbicas intermoleculares del polímero (Wistler *et al*, 1997).

La emulsión B es más bien una suspensión coloidal; pues no se pudieron entrecruzar microcápsulas, solo el quitosano en forma de velo, tipo película, pues se detecta nitrógeno en los análisis con ninhidrina y análisis elemental. El comportamiento térmico de la HPMC ocurre cuando la solución se calienta al aplicar el pre-tratamiento de entrecruzamiento (70 °C/5 min); la solución se coagula dando una masa que no fluye fácilmente, semi-flexible.

Esta temperatura crítica de coagulación está inversamente relacionada tanto con la concentración de HPMC como con la concentración de grupos metoxilo presentes en la macromolécula de la HPMC, la cual puede contener entre el 28-30% de grupos metoxilo y 8-12% de grupos hidroxilo; por lo que depende tanto del grado de sustitución de los grupos metoxilo como de la sustitución molar (Wistler *et al*, 1997). Así, la viscosidad resultante es directamente relacionada a la concentración de grupos metoxilo, por lo tanto, entre más alta sea la concentración de la HPMC más viscosa o menos flexible será la masa resultante.

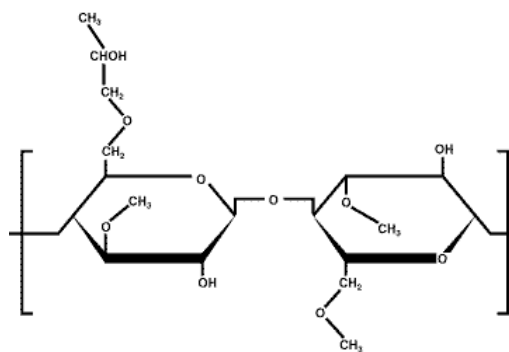


Fig. 24. Estructura idealizada de Hidroxi-propil-metil celulosa, HPMC.

La HPMC-2910, cuyo número proviene de los 29 propilos y 10 metilos (información del proveedor), en una solución acuosa al 2% p/v tiene una viscosidad de entre 40 y 60 mPa·s a 20°C. Por el contrario, una emulsión con 20% p/v de MD-DE10, valor que corresponde a 10 equivalentes de dextrosa, tiene una viscosidad de aproximadamente 8 mPa·s. La viscosidad de las maltodextrinas en solución acuosa depende del número de oligómeros que contenga y del grado de polimerización de las unidades de glucosa (Dokic-Baucal *et al*, 2004). En efecto, una emulsión de MD-DE10 al 25% p/v tuvo una viscosidad de 9.23 mPa·s, lo cual es 6 veces menos viscosa que una emulsión de HPMC. En resumen, la combinación de estos factores muestra que el uso de HPMC en combinación con quitosano no es útil para lograr el entrecruzamiento del quitosano ni para obtener microcapsulas para su posterior entrecruzamiento.

La distribución del tamaño de las microcápsulas en los textiles funcionalizados fue determinada por SEM; el tamaño predominante para la muestra M1 (Figura 25a), fue de entre 1.4 y 1.88 μm ; mientras que para la muestra M3 (Figura 25b), el tamaño representativo

fue de entre 0.8 a 1.6 μm , correspondiendo aproximadamente al 23% de la población de la muestra. Estos valores del tamaño de las microcápsulas son similares a los obtenidos por secado por aspersión (Fig. 20b).

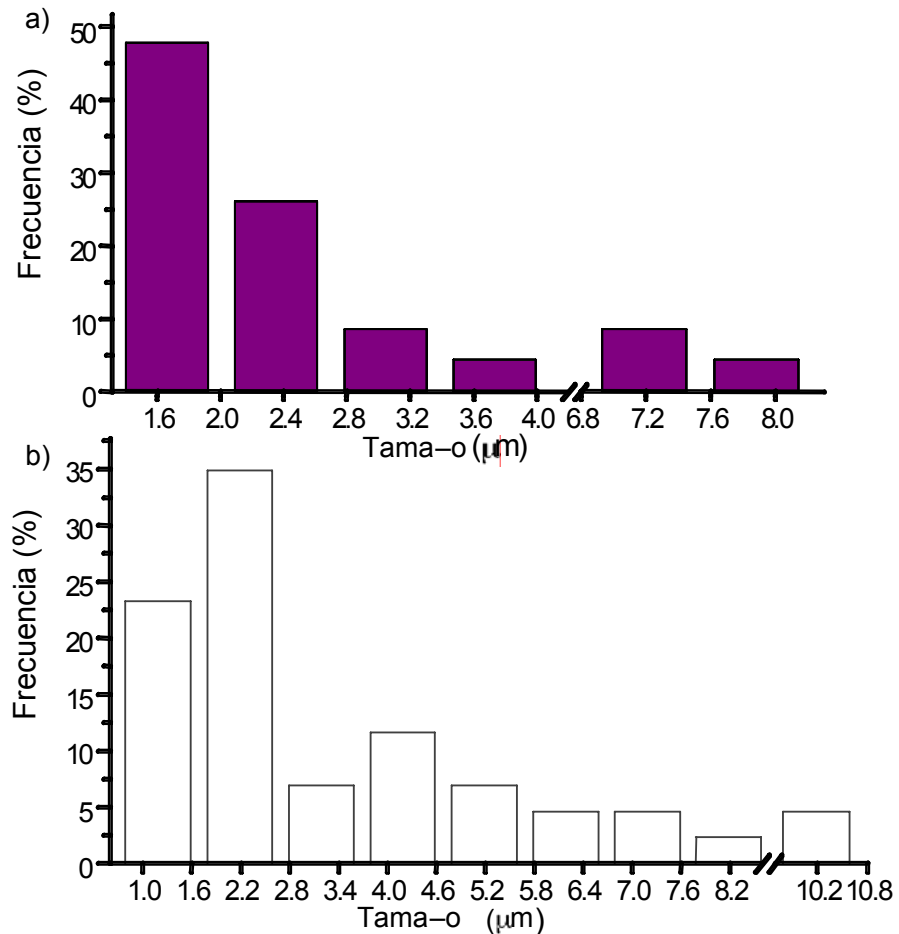


Fig. 25. Histogramas de la distribución del tamaño de las microcápsulas entrecruzadas al textil de celulosa: **a)** Muestra M1; **b)** Muestra M3.

El efecto del paso del tiempo sobre la permanencia del aroma en los textiles funcionalizados con las microcápsulas con AET fue monitoreado para determinar la pérdida de los compuestos volátiles por medio de análisis de GC-MS, después 6 meses de almacenaje en un lugar seco a 20 °C. El resultado evidenció que los textiles funcionalizados, M1 y M3, mantuvieron el aroma aún después de este periodo, presentando un alto contenido

de D-limoneno en ambas muestras, aproximadamente de 2×10^6 au (Figura 26). Esto indica que el encapsulamiento con quitosano o con quitosano-MD es efectivo y duradero.

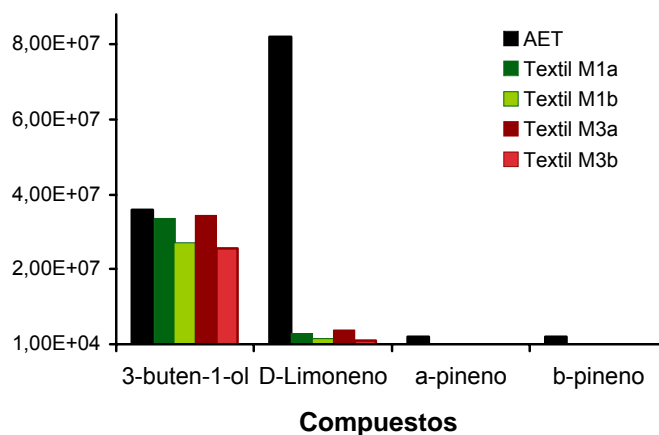


Fig. 26. Compuestos del aceite esencial de toronja determinado por GC-MS en los textiles funcionalizados. AET: Aceite esencial de toronja. M1a y M3a: textiles funcionalizados al tiempo 0, M1b y M3b: textiles funcionalizados almacenados durante 6 meses.

Las pruebas experimentales evidenciaron el hecho de que las microcápsulas con aceite esencial a base de quitosano pueden ser entrecruzadas en textil de celulosa con un proceso simple. Cabe recordar que la mayoría de los trabajos ya reportados sobre microencapsulación por coacervación o por un entrecruzamiento se llevaron a cabo usando reactivos tóxicos como glutaraldehído (Nelson, 2002; Badulescu *et al*, 2008). En nuestro caso, el uso de una emulsión con 2% p/v de quitosano o 22% p/v de quitosano-MD, permitió entrecruzar microcápsulas por un proceso no tóxico, el cual puede extender el número y tipo de aplicaciones de éstos materiales funcionales.

10.2.3 Determinación de la inhibición bacteriana con los textiles de celulosa funcionalizada.

El porcentaje de inhibición con las bacterias usadas en esta sección experimental, *E.coli* y *S.epidermidis*, en relación con el testigo (sólo medio de cultivo), calculado con la

ecuación 4 (capítulo 9) resultó ser de casi el 100% hasta las 54 h de incubación con *E.coli* y hasta las 48 h de incubación con *S. epidermidis*, como se puede observar en la Figura 27.

En esta figura (27) se puede observar que la cepa de *E. coli* usada fue ligeramente más sensible al contacto con la muestra del tratamiento M1 (con mayor contenido de quitosano) pero esto se debe no, sólo a la presencia del quitosano, sino también a la presencia del aceite esencial. La *E. coli*, por ser una bacteria Gram-negativa, tiene endotoxinas en la pared celular, al contrario de las Gram-positivas, como el *S. epidermidis*. La estructura de la pared celular de las bacterias es un factor determinante para la eficiencia de nuestro material funcionalizado, pues la presencia de moléculas de lipopolisacáridos le brinda una superficie hidrofílica a la bacteria y los grupos aniónicos le dan estabilidad por interacciones electrostáticas con cationes divalentes (Kong *et al*, 2008). La remoción de estos cationes (de la pared celular) con un agente quelante, como el quitosano, puede resultar en una desestabilización exterior de la membrana celular a través de la liberación de moléculas de lipopolisacáridos. Así, la membrana externa que sirve como barrera para la penetración de macromoléculas y compuestos hidrofóbicos se vuelve permeable; de ahí la eficacia antibacteriana de nuestras microcápsulas a base de quitosano.

Las tasas específicas de crecimiento de ambas bacterias, al contacto con las muestras aquí funcionalizadas con microcápsulas de quitosano, se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Tasas específicas de crecimiento (μ)^a para *E. coli* y para *S. epidermidis* con los textiles funcionalizados estimadas con un modelo exponencial.

Tratamiento	<i>Escherichia coli</i> .		<i>Staphylococcus epidermidis</i> .	
	$\mu(\text{h}^{-1})^a$	R ²	$\mu(\text{h}^{-1})^a$	R ²
Control (sólo medio)	1.07 ± 0.06	0.961	0.57 ± 0.04	0.962
Textil de celulosa crudo (blanco)	0.51 ± 0.07	0.986	0.15 ± 0.01	0.946
Muestra M1	0.43 ± 0.08	0.957	0.13 ± 0.01	0.898
Muestra M3	0.26 ± 0.06	0.964	0.13 ± 0.02	0.884

^aTasa específica de crecimiento (μ en h^{-1}) estimado de los datos experimentales de las unidades formadoras de colonias con la Ec. 3.

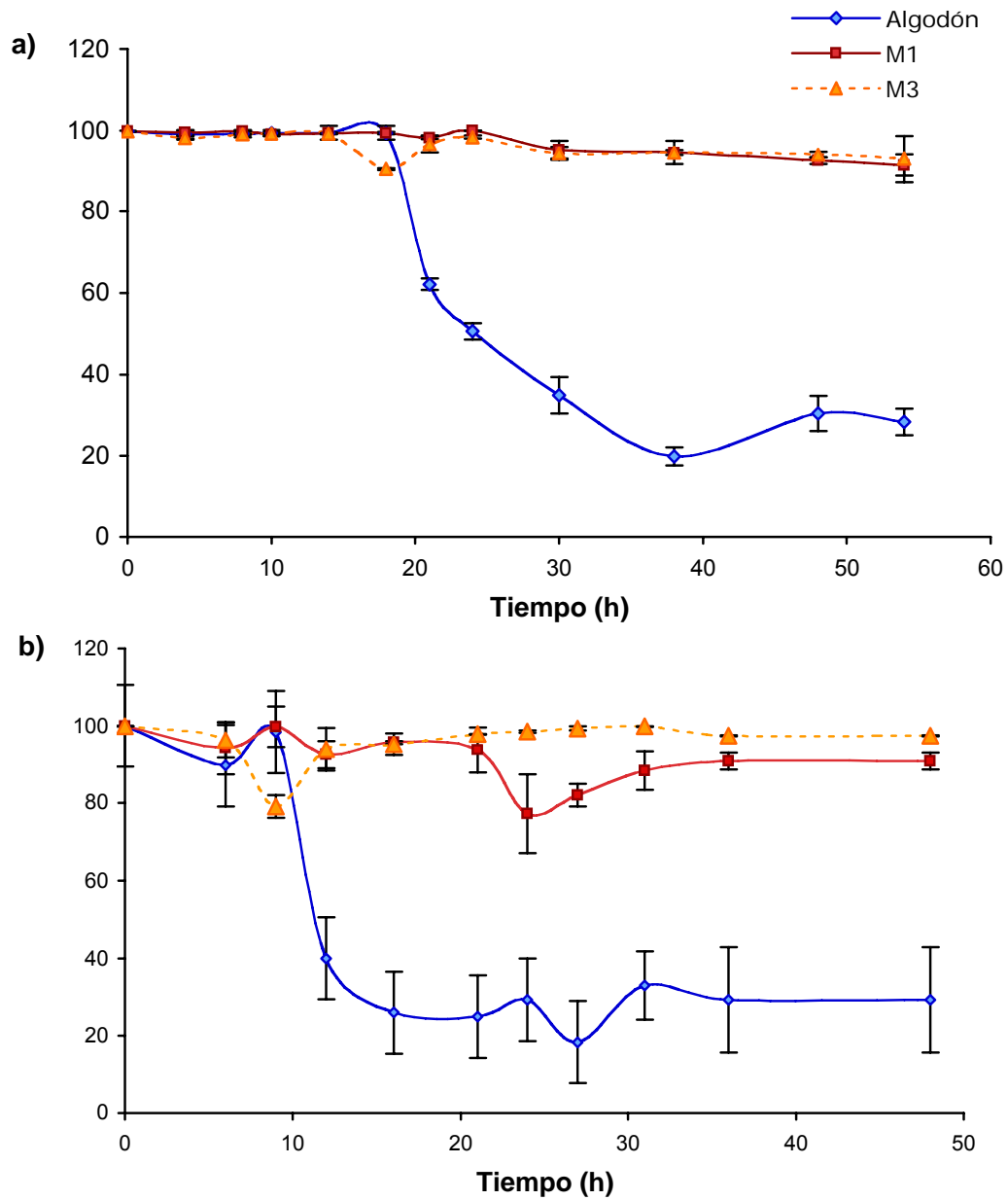


Fig. 27. Porcentaje de inhibición de: **a)** *E. coli*, **b)** *S. epidermidis*, ambos con los textiles funcionalizados, M1 y M3.

La tasa obtenida para *E. coli* con la muestra M3 fue de al menos la mitad que la obtenida con esta misma cepa con el textil de celulosa crudo, y también fue menor que con

la muestra M1. Estos resultados indican que la cepa fue más sensible con la muestra M3 que con la M1; sin embargo, el porcentaje de inhibición de *E. coli* fue muy efectivo con ambas muestras, M1 y M3, sin diferencia significativa entre ellas (fig. 26a). Para el *S. epidermidis*, la tasa específica de crecimiento fue la misma con la muestra M1 y M3, y con ambas muestras la tasa fue 4 veces menor que con el control; el porcentaje de inhibición este microorganismo fue de casi 100% con ambas muestras durante las primeras 24 h sin diferencia significativa entre ellas (fig.27b). En contraste, con la muestra M1, este porcentaje disminuye ligeramente después de transcurrido este tiempo, llega cerca de 90% hasta las 48 h. La eficiencia de la inhibición de estas bacterias con nuestros materiales funcionalizados puede ser atribuido totalmente a la estructura de la membrana celular como se describió.

Debido a que la cepa de *E. coli* fue ligeramente más sensible, se realizó la observación por microscopía electrónica de barrido (SEM) de una muestra del tratamiento M1, después de estar incubada por 54 h a 37°C con esta cepa.

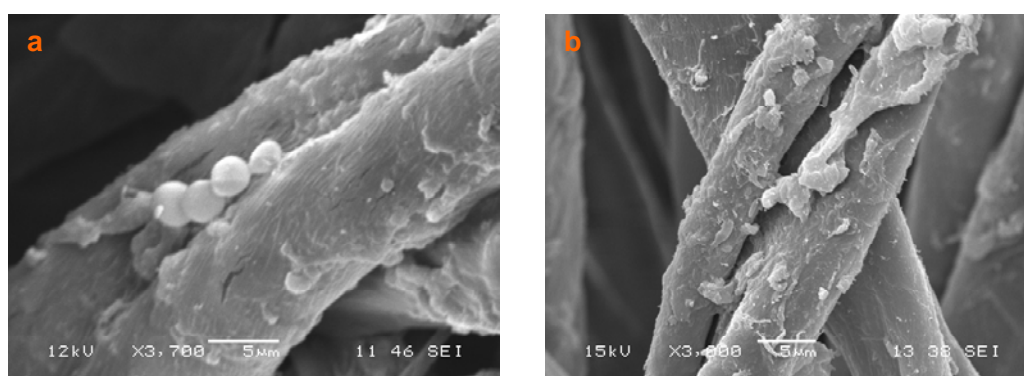


Fig. 28. Micrografías electrónicas de barrido: **a)** y **b)** textil funcional, muestra M1 después de 54h de incubación a 37°C en medio nutritivo con *E. coli*.

En las micrografías que se muestran en la Figura 28 es posible observar que la fibra y algunas de las microcápsulas no sufrieron ningún cambio, lo cual es consistente con los resultados del porcentaje de inhibición de esta bacteria presentados en la Figura 27a. Kong *et al* (2008) reportaron micrografías similares de *E. coli* en contacto con microcápsulas de quitosano, donde se observan ciertas partículas que se consideran restos de bacterias que sufren lisis. Este se atribuye al quitosano, el cual puede causar la destrucción de la

membrana citoplasmática de la bacteria, permitiendo el rompimiento de la membrana después de un tiempo suficiente de contacto (54 h).

10.3 Conclusiones

Esta parte del trabajo describe un proceso efectivo, no-tóxico para la obtención de textiles de celulosa entrecruzados con micropartículas de quitosano que encapsulan aceite esencial de toronja. Este método está basado en el tratamiento directo de las fibras de celulosa previamente irradiada con luz UV, con emulsiones de quitosano en un proceso simple. Los materiales obtenidos presentan propiedades antimicrobianas sobre dos cepas indeseables, además de mantener aroma agradable por periodos largos de tiempo.

11. CONCLUSIONES GENERALES

Debido a la fina caracterización del M_w , GP y F_A de los quitoooligosacáridos aquí analizados se comprobó la relación de estas características con el efecto prebiótico de estos oligos sobre bacterias ácido lácticas.

Los tratamientos de funcionalización de textiles de celulosa de este trabajo se lograrán con el uso de reactivos químicos no tóxicos y, fueron eficientes para la fijación de quitosano vía una reacción de esterificación. Esta reacción entre la celulosa y el quitosano se lleva cabo en el carbono 6 del quitosano, dejando libre el grupo amino de éste, del cual dependen las propiedades antimicrobianas de éste.

El uso de textil de celulosa previamente irradiada con luz UV incrementó la cantidad de quitosano entrecruzado.

La fijación del quitosano así como de las microcápsulas de quitosano en el textil de celulosa se mantuvo, aún después de que fueron lavados, debido al entrecruzamiento por la reacción de esterificación y con esto se logró también una notable inhibición de microorganismos indeseables.

El porcentaje de inhibición fue similar al obtenido con la gasa comercial, la cual contiene un tratamiento químico antimicrobiano. Sin embargo, durante las primeras 12 h de contacto del *P.chrysogenum* con el tratamiento con mayor contenido de quitosano, la inhibición fue mejor que con la gasa comercial.

También se obtuvo una efectiva inhibición con los textiles funcionalizados con microcápsulas de quitosano sobre cepas como *E. coli* y *S. epidermidis*. Se mantuvo además, un agradable aroma hasta por más de 6 meses de almacenamiento, debido a la permanencia del aceite esencial de toronja, con lo que se comprueba la eficiencia del quitosano para la encapsulación de nuestro proceso.

PERSPECTIVAS

Los textiles cosméticos y funcionales son una idea totalmente vanguardista. Actualmente empresas como Adidas, Nike y L'Oréal tienen un gran interés en el desarrollo y aplicación de los textiles cosméticos, indicando que el mercado está empezando a aceptar y demandar la novedad de textiles activos. La tendencia muestra que el desarrollo de textiles cosméticos refleja las necesidades de cuidado personal consciente de la gente en las condiciones de vida actual, implicando con esto el cuidado de los procesos para con el medio ambiente. Por supuesto, para el desarrollo acelerado de los procesos de textiles cosméticos desde la idea hasta el producto final, es necesaria más investigación conducida especialmente hacia la eficiencia, toxicidad y durabilidad de los productos.

Estudios actuales en esta línea se encuentran aún en lo que se podría decir sus inicios, pero los consumidores ya están generando gran interés sobre estos productos. Por lo que este trabajo de investigación así como los futuros basados en éste que sigan la misma línea, son necesarios, innovadores y aplicables en nuestra vida cotidiana. Sin duda los textiles cosméticos pueden proveer grandes ventajas a los usuarios, por lo que los efectos de estos textiles debe ser objetivamente analizado y reportado.

El aspecto o apariencia así como la textura de estos textiles les brindará un valor agregado, pues está relacionado con la favorable aceptación de éstos por el consumidor, por lo que esa parte de la investigación en el área física es de gran relevancia y desafortunadamente no fue explorada en este trabajo, por lo que se recomienda investigación y trabajo experimental al respecto.

12. PUBLICACIONES

1. Alonso, D.; Gimeno, M.; Olayo, R.; Vázquez-Torres, H.; Sepúlveda-Sánchez, J.D.; Shirai, K. (2009). Cross-linking chitosan into UV-irradiated cellulose fibers for the preparation of antimicrobial-finished textiles. *Carbohydrate Polymers* (doi:10.1016/j.carbpol.2009.01.027).

13. REFERENCIAS

- Agulló, E.; Rodríguez, M.S.; Ramos, V.; Albertengo, L. (2003). Present and Future Role of Chitin and Chitosan in Food. *Macromolecular Bioscience*, 10, 521-530.
- Aitex. (2003). MICROENCAPSULACIÓN: Nuevas capacidades para los textiles tradicionales. *Revista Aitex*, 9,14-15.
- Amiji, M.M. (1995). Permeability and blood compatibility properties of chitosan-poly (ethylene oxide) blend membranes for haemodialysis. *Biomaterials*, 16, 593-599.
- A.O.A.C. (1980). Official Methods of Analyses of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Badulescu, R.; Vivod, V.; Jausovec, D.; Voncina, B. (2008). Grafting of ethylcellulose microcapsules onto cotton fibers. *Carbohydrate Polymer*, 71, 85-91.
- Bahrke, S.; Einarsson, J.M.; Gislason, J.; Haebel, S.; Letzel, M.; Peter-Katalinic, J. and Peter, M.G. (2002). Sequence Analysis of chitooligosaccharides by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Postsorce Decay Mass Spectrometry. *Biomacromolecules*, 3, 4: 696-704.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
- Beijerinck, M.W. (1901). Sur lês fermentes lactiques de l'industrie. *Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles*, (Sección 2) 6: 212-243.
- Bernkop-Schnürch, A. (2000). Chitosan and its derivatives: potencial excipients for personal peptide delivery systems. *International Journal of pharmaceutics*, 194(2), 239-247.

- Biruss, B., Valenta, C. (2006). Skin permeation of different steroid hormones from polymeric coated liposomal formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 62(2), 210-219.
- Cardenas, G.; Miranda, S.P. J. (2004). FTIR and TGA studies of chitosan composite films. *Journal of Chilean Chemical Society*, 49 (N4), 291-295.
- Chaibi, A.; Ababouch, L.H.; Belasri, S.; Boucetta, S. and Busta, F.F. (1997). Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62A spores by essential oils. *Food Microbiology*, 14, 161-174.
- Chan, V.; Mao, H-Q; Leong, K.W. (2001). Chitosan-Induced Perturbation of Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine Membrane Bilayer. *Langmuir*, 17(12), 3749-3756.
- Chang, J.C.S.; Foarde, K.K.; VanOsdell, D.W. (1996). Assessment of fungal (*Penicillium chrysogenum*) growth on three HVAC duct materials. *Environmental International*, 22 (4), 425-431.
- Chung, Y-S.; Lee, K-K.; and Kim, J-W. (1998). Durable press and antimicrobial finishing of cotton fabrics with a citric acid and chitosan treatment. *Textile Research Journal*, 68(10) 772-775.
- Cook, J. G. (1984). A natural fibers of vegetable origin. In J. G. Cook (Ed.), Handbook of textile fibers I Natural fibers (pp. 58-78). Durham, England: Merrow.
- Curotto, E.; Aros, F. (1993). Quantitative determination of chitosan and the percentage of free amino groups. *Analytical Biochemistry*, 211,240-241.
- Deshpande, M.V. (1986). Enzymatic degradation of chitin and its biological applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 45: 273-281.
- Dokic-Baucal, L.; Dokic, P.; Jakovljevic, J. (2004). Influence of different maltodextrins on properties of O/W emulsions. *Food Hydrocolloid*, 18 (2), 233-239.
- Fang, N.; Chan,V.; Mao, H-Q.; Leong, K.W. (2001). Interactions of Phospholipid Bilayer with Chitosan: Effect of Molecular Weight and pH. *Biomacromolecules*, 2 (4), 1161-1168.
- Feng, L.; Li, S.; Li, Y.; Li, H.; Zhang, L.; Zhai, J.; Song, Y.; Liu, B.; Jiang, L.; Zhu, D. (2002). Super-hydrophobic Surfaces: From natural to artificial. *Advanced Materials*, 14, 1857-1860.

- Galed, G. (2004). Biopolímeros Quitina/Quitosano: Optimización de los procesos de obtención y caracterización funcional. Tesis. [http://www.kriptia.com/ QUIMICA/ BIOQUIMICA/ GLUCIDOS/ 1#108694](http://www.kriptia.com/QUIMICA/BIOQUIMICA/GLUCIDOS/1#108694)
- Gibson, G.R. & Roberfroid M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125, 1401-12.
- Goddard, J.M.; Hotchkiss, J.H. (2007). Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science*, 32, 698-725.
- Infante, G. S.; Zárate de Lara, G.P. (1986). *Métodos Estadísticos*, Capítulo 2. Trillas, México, D.F.
- Jeon, Y.J. & Kim, S.K. (2000). Continuous production of chitooligosaccharides using a dual reactor system. *Process Biochemistry*. 35, 623-632.
- Jeon, Y, J., Park, P.J., Kim, S.K. (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, 44, 71-76.
- Joseph, M.C. (1988). Natural cellulosic fibers. In M.C. Joseph (Ed.), *Essentials of textiles* (pp. 66-68). New York: Holt, Rinehart y Winston.
- Kaiser, E.; Colescott, R.L.; Bossinger, C.D.; Cook, P.I. (1970). *Analytical Biochemistry* 34, 595.
- Kissinger, J.B. (1999). *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, Ed. Gaylord, vol 14, p.717, Wiley, New York.
- Klemm, D.; Heublein, B., Fink, H.P., Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *ChemInform* 36 (36). (doi: 10.1002/chin.200536238)
- Kong, M.; Chen, X.-G.; Liu, C.-S.; Liu, C.-G.; Meng, X.-H.; Yu, L.-J. (2008). Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E.coli*. *Colloid and Surface B: Biointerfaces*, 65, 197-202.
- Lárez, C.V. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*, 1(2), 15-21.
- Lee, H.W., Park, Y.S., Jung, J.S., Shin, W.S. (2002). Chitosan oligosaccharides, dp 2-8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus* sp. *Anaerobe*, 8, 319-324.

- Li, Q., Dunn, E.T., Grandmison, E.W. y Goosen, M.F.A. (1997). Applications and properties of chitosan. En: Applications of chitin and chitosan. Edited by Mattheus F.A. Goosen. Technomic Publishing Company, Inc. U.S.A.
- Lim, S.H., Hudson, S.M. (2004a). Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. *Carbohydrate Research*, 339: 313-319.
- Lim, S.H.; Hudson, S.M. (2004^b). Application of a fiber-reactive chitosan derivative to cotton fabric as an antimicrobial textile finish. *Carbohydrate Polymer*, 56(2), 227-234.
- Liu, H., Du, Y., Wang, X., Hu, Y., Kennedy, J.F. (2004). Interaction between chitosan and alkyl β -D-glucopyranoside and its effect on their antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, 56(2), 243-250.
- Lopatin, S.A., Ilyin, M., Pustobaev, V.N.; Bezchetnikova, Z.A.; Varlamov, V.P. & Davankov, V.A. (1995). Mass spectrometric analysis of N-acetylchitooligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis. *Analytical Biochemistry*, 227, 285-288.
- Maji, T.K.; Baruah, I.; Dube, S.; Hussain, M.R. (2007). Microencapsulation of *Zanthoxylum limonella* oil (ZLO) in glutaraldehyde crosslinked gelatin for mosquito repellent application. *Bioresource Technology*, 98, 840-844.
- Martínez, J.L. (2005). Tendencias del algodónero en México. *Papers INIFAP*, http://www.alidaalgodon.org/meetings/2005/papers/spanish/s_mexico_carrillo.pdf
- Mather, R.R. (2001). Intelligent textiles, Review of progress in coloration and related topics. *Society of dyers and colourist*, 31, 36-41.
- MeSH. (2009). Medical Subject Headings. *Nacional Library of medicine*. <http://wwwcf.nlm.nih.gov/class>
- Muzzarelli, R.A.A. (1977). Chitin, chelation of metal ion. Pergamon. Oxford, England, pp.139-154.
- Muzzarelli, R.A.A, Rochetti, R. (1985). Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 5, (6), 461-472.
- Muzzarelli, R.A.A. (1998). Colorimetric determination of chitosan. *Analytical Biochemistry*, 20 (2), 255-257.

- Nelson, G. (2002). Application of microencapsulation in textiles. *International Journal of Pharmaceutics*, 242, 55-62.
- No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., Meyers, S.P. (2002). Antibacterial activity of chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 65-72.
- Pascual, E.; Julià, M.R. (2001). The role of chitosan in wool finishing. *Journal of Biotechnology*, 89(2-3), 298-296.
- Pitler, M.H. (1999). Randomized, double-blind trial of chitosan for body weight reduction. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53, 379-381.
- Plascencia, J.M.; Viniegra, G.; Olayo, R.; Castillo, M.M.; Shirai, K. (2003). Effect of Chitosan and Temperature on Spore Germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), 582-586.
- Prochazkova, S.; Vårum, K.M.; Østgaard, K. (1999). Quantitative determination of chitosans by ninhydrin. *Carbohydrate Polymers*, 38, 115-122.
- Rabek, J.F. (1996). Photodegradation of Polymers, Physical Characteristics and Applications, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Reagor, L., Gusman, J., McCoy, L., Carino, E., Heggors, J.P. (2002). *Journal of Alternative and Complement Medicine*, 8, 325-332.
- Roberfroid, M. and Slavin, J. (2000). Nondigestible oligosaccharide. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 461-480.
- Ribeiro, C., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., Miranda, C. (2007). Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence. *Postharvest Biology and Technology*, 4(1), 63-70.
- Sahagún, O.J. (1997). Métodos de microscopía electrónica de barrido en Biología. Univ. de Cantabria. España.
- Salgado, C. (2009). Los nuevos textiles activos. *Revista de la innovación textil*, 7, http://www.tecnitex.es/pdf/4los_nuevos_textiles_activos.pdf
- Salonen, H.; Lappalainen, S.; Lindroos, O.; Harju, R.; Reijula, K. (2007). Fungi and bacteria in mould-damaged and non-damage office environments in a subarctic climate. *Atmospheric Environment*, 41, 6797-6807.

- Sato, T., Ishii, T., Okahata, Y. (2001). In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials*, 22(15), 2075-2080.
- Schiffman, J.D., & Schauer, C.L. (2007). Cross-linking chitosan fibers, *Biomacromolecules*, 8, 594-601.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. & Jeon, Y.J. (1999). Food applications of chitin and chitosan. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 37-51.
- Sharma, H.S.S. (1996). Compositional analysis of neutral detergent, acid detergent, lignin and humus fractions of mushroom compost. *Thermochimica Acta*, 285(2), 211-220.
- Shi, H.; Xin, J.H. (2007). Cosmetic Textiles: concepts, application and prospects. <http://dspace.lib.fcu.edu.tw:8080/dspace/bitstream/2377/3947/1/ce05atc902007000070.pdf>
- Shin, Y.; Hollies, N.R.S.; Yeh, K. (1989). Polymerization-crosslinking of cotton fabric for superior performance properties. *Textile Research Journal*, 11, 635-642.
- Shin, Y.; Yoo, D.I.; Jang, J. (2001). Molecular Weight effect on antimicrobial activity of chitosan treated cotton fabrics. *Journal of Applied Polymer Science*, 80, 2495-2501.
- Shirai, C.K.; Guerrero, I. & Hall, G.M. (1996). La quitina, ocurrencia, propiedades y aplicaciones. *Ciencia*, 47 (4): 317-328.
- Shirai, C.K.; Guerrero, M.I.; Huerta, S., Saucedo, G.; Hall, G.M. (1996b). Fermentación láctica de cabeza de camarón. *Avances en Ingeniería Química*, 6(3), 239-241.
- Sinha, V.R.; Singla, A.K.; Wadhawan, S.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Bansal, K.; Dhawan, S. (2004). Chitosan microspheres as a potencial carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 274, 1-33.
- Sionkowska, A.; Kaczmarek, H.; Wisniewski, M.; Skopinska, J.; Lazare, S.; Tokarev, V. (2006). The influence of UV irradiation on the surface of chitosan films. *Surface Science*, 600, 3775-3779.
- Smilanick, J.L.; Hartsell, P.I.; Henson, D.; Fouse, D.C.; Assemi, M.; Harris, C.M. (1990). Inhibitory activity of sulphur dioxide on the germination of spores of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 80(2), 217-220.

- Sun, S-W.; Lin Y-C.; Weng, Y-M.; Chen, M-J. (2004). Efficency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 112-117.
- Takeuchi, H., Matsui, Y., Yamamoto, H., Kawashima, Y. (2003). Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats. *Journal of controlled release*, 86 (2-3), 235-242.
- Takeuchi, H., Matsui, Y., Sugihara, H., Yamamoto, H., Kawashima, Y. (2005). Effectiveness of submicron-sized, chitosan-coated liposomes in oral administration of peptide drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 303(11), 1583-1594.
- Tirillini, B. (2000). Grapefruit: the last decade acquisitions. *Fitoterapia*, 71, 29-37.
- Uchida, Y., Izume, M. and Ohtakara, A. (1989). Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application. In G.Skjak-Braek, T. Anthonsen and P. Sanford, *Chitin and chitosan* (pp. 373-382). London: Elsevier
- Vander, P., Varum, K.M., Domard, A., El Gueddari, N.E. & Moerschbacher, B.M. (1998). Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiology*, 118: 1353-1359.
- Weimer, P.J.; Haigler, C. (1991). Biosynthesis and biodegradation of cellulose. New York: Dekker.
- Yamada, K.; Yamada, Y. (1997). Patente Japonesa, JP 9653319 A2. 6.
- Yang, C.Q. (1993). Effect of pH on the Nonformaldehyde durable press finishing of cotton fabrics: FT-IR spectroscopy study, Part I: ester crosslinking. *Textile Research Journal*, 61, 420-430.
- Yang, C.Q. (1993). Effect of pH on Nonformaldehyde durable press finishing of cotton fabric: FT-IR spectroscopy study. Part II: formation of the anhydride intermediate. *Textile Research Journal*, 63(12), 706-711.
- Zhang, Z.; Chen, L.; Ji, J.; Huang Y.; Chen, D. (2003). Antibacterial properties of cotton fabrics treated with chitosan. *Textile Research Journal*, 73(12), 1103-1106.

ANEXOS

ANEXO 1

1. Técnicas para la caracterización de quitosano y quitooligosacáridos

- **Grado de Desacetilación (GD):** Se determinó el grado de desacetilación con la ayuda de un espectrofotómetro por el método de la primera derivada UV/Visible, ésta técnica se basa en determinar el grado de acetilación del quitosano en soluciones de ácido acético, usando 1g de quitosano por L de acético 0.01M, usando la primera derivada en un espectrofotómetro de ultra violeta a una longitud de onda de 199nm, pues a esta se tienen lecturas de las absorbencias de N-acetil glucosamina y son linealmente dependientes a su concentración y no son influenciadas por la presencia del ácido acético. Y se llevó a cabo como se describió en la metodología del capítulo 7, siguiendo los siguientes pasos:

Se realizó una curva de calibración usando como patrón N-acetil-glucosamina (NAG), ésta se obtuvo preparando soluciones de diferentes concentraciones de NAG 10, 20, 30 y 40 ppm en solución de ácido acético (0.01M). La concentración de los residuos acetilados fue determinada a partir de sus valores absorbencia, graficando la 1ª derivada contra la longitud de onda. Se usó agua bidestilada como blanco; se hizo un barrido en un espectrofotómetro de UV-visible (GBC UV-visible 918, UK), de la 1ª derivada de las soluciones de NAG a diferentes concentraciones (10, 20, 30 y 40 ppm) a una longitud de onda de entre 190 y 240 nm. Se obtuvo la primera derivada de la absorbencia de las disoluciones en ácido acético y se determinó el punto de corte, que es el punto donde cruzaron las curvas.

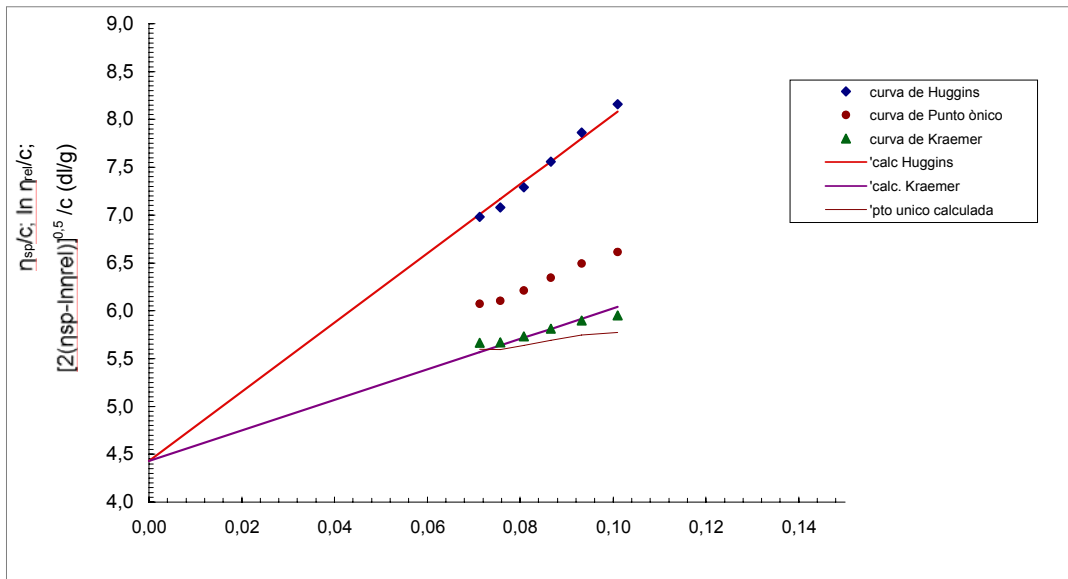
Se preparó una solución de quitosano en ácido acético 0.1M, con una concentración de 10mg/mL de disolvente. Se hizo la lectura de la muestra en el equipo a la λ específica del valor del punto de corte obtenido con la curva de calibración y por sustitución en la curva de calibración se conoció el grado de acetilación, el cual fue restado de un 100% por consiguiente se pudo tener el grado de desacetilación (Muzzarelli y Rochetti, 1985).

- **Peso Molecular (M_w):** Se obtuvo con base en su viscosidad intrínseca, ésta es

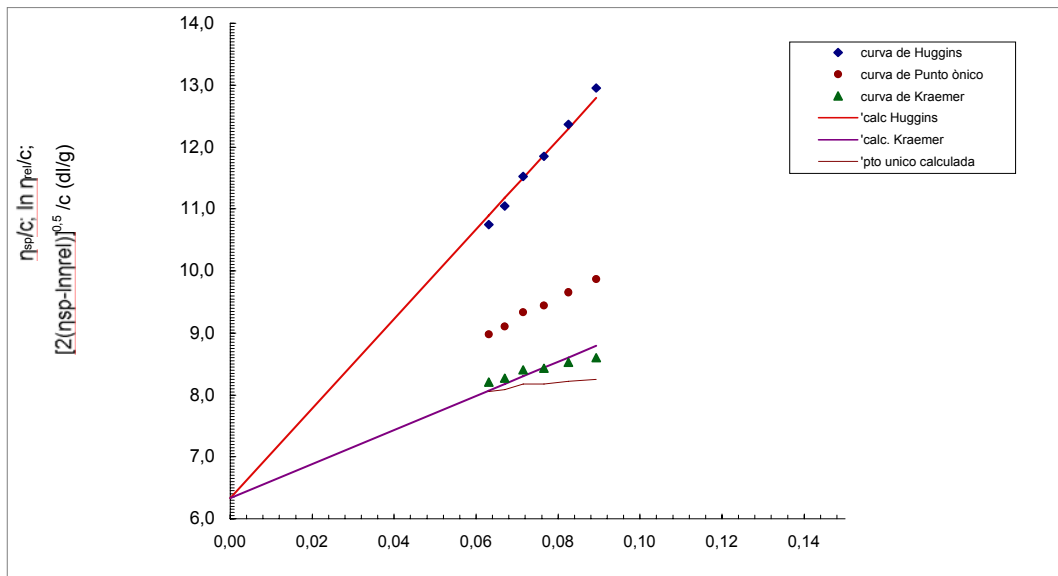
determinada por el tamaño y la forma de las moléculas individuales del polímero en solución.

Para calcular la viscosidad intrínseca se emplearon las ecuaciones de Huggins-Kraemer que nos brindan coeficientes cuyos valores se calculan a partir de las pendientes de las rectas que se obtienen al representar simultáneamente la η_{sp}/c y el $\ln(\eta_{red}/c)$ frente a la concentración. Por el corte común de ambas rectas sobre el eje de ordenadas $c=0$, se obtiene el valor de $[\eta]$ (Kissinger, 1999). Esta viscosidad está relacionada con el peso molecular a través de la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada, la cual requiere el uso de valores constantes de $K=1.81 \times 10^{-3}$ y $a=0.93$ por la constante de viscosidad específica del disolvente, en este caso el llamado Roberts, que es una solución de ácido acético 0.1M y cloruro de sodio (NaCl) 0.2M (Galed 2004).

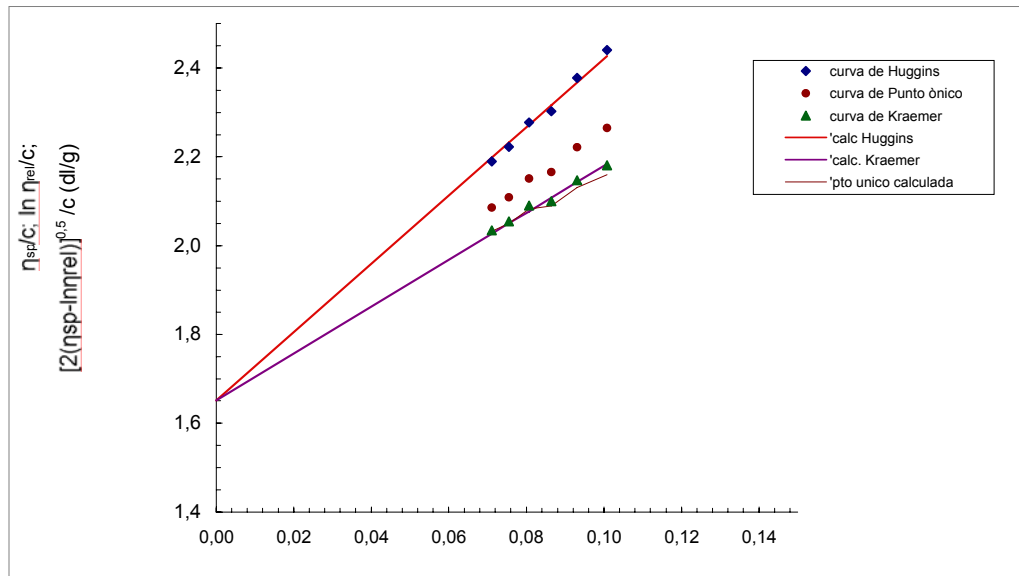
Para esta determinación se preparó una solución de quitosano en el disolvente, Roberts 0.1% p/v; una vez disuelto se filtró para eliminar impurezas. Se realizaron medidas de viscosidad por triplicado, primero del disolvente, luego de la muestra y de las diluciones de la muestra con el disolvente, en un viscosímetro tipo Ubbelohde con capilar de 1.03 mm de diámetro (Schott-Geräte, No.525.20/II, Alemania), en un baño de agua a temperatura constante (25°C). Posteriormente, los datos se ingresaron a una hoja de cálculo que por medio de iteraciones se pudo obtener el peso molecular y la viscosidad intrínseca del quitosano. A continuación se presentan las curvas obtenidas con las iteraciones usando las diferentes ecuaciones para la viscosidad intrínseca antes descritas de los quitosanos aquí caracterizados.



a. Curvas de viscosidad del quitosano comercial 85-500-A1, obtenidas para la determinación de su peso molecular.



b. Curvas de viscosidad del quitosano comercial 80-4000-A1, obtenidas para la determinación de su peso molecular.



- c. Curvas de viscosidad del quitosano comercial 85-4000-A1, obtenidas para la determinación de su peso molecular.
- **Viscosidad:** La determinación de esta propiedad se realizó a cada una de las soluciones de los quitosanos comerciales descritos antes, con la ayuda de un viscosímetro tipo Ubbelohde con capilar de 1.03 mm de diámetro (Schott-Geräte, No.525.20/II, Alemania). Se realizaron las medidas por triplicado, primero del disolvente, luego de la muestra (quitosano en el disolvente), en un baño de agua a temperatura constante (25°C).
 - **Permeación en gel (GPC):** La cromatografía de permeación en gel (GPC) que se ha denominado de tamices moleculares o filtración en gel, es un tipo de cromatografía sólido-líquido que separa partículas o polímeros polidispersos en fracciones por tamizado mediante un gel, el cual sirve como fase estacionaria y en donde las partículas de mayor tamaño o peso molecular más grande se separan antes. De éste modo, el GPC puede separar las fracciones por tamaño, esta técnica se usó para la separación de quitooligosacáridos comerciales para poder caracterizarlos. 10 mg de los oligosacáridos se disolvieron en un tubo eppendorf de 2 mL con 1.5 mL de solución amortiguadora de 0.05M de acetato de amonio ajustado con 0.23M de ácido acético a pH 4.2, y fueron pasados por una columna empacada con Biogel P4, grado

fino (BioRad, Munich, Alemania) con las siguientes dimensiones: 2.5cm d.i. x 200cm; la misma solución amortiguadora fue usada como fase móvil. Se ajustó la velocidad de flujo a 25 mL x h⁻¹ y se usó un detector Shimadzu (RID 6A E.U.A.) con el que se dibujaron picos, los cuales fueron indicativos de cada una de las fracciones en las que se separó cada uno de los lotes de oligosacáridos. Las fracciones se obtuvieron en tubos de ensayo de 6 mL, los cuales se combinaron apropiadamente en matraces, de acuerdo al volumen de cada fracción indicada por el detector; este volumen colectado en los matraces se concentró a pequeños volúmenes, evaporando el agua, y los residuos fueron liofilizados para su posterior análisis.

- **MALDI-Tof:** Se usó un equipo de MALDI, Bruker Reflex II (Bruker Daltonik, Bremen, Alemania) en el modo de ión positivo (ToF). Para la ionización se usó un laser de nitrógeno (337 nm, 3 ns de ancho de pulso, 3 Hz).

Cada muestra de oligosacáridos se disolvió en 500 µL de metanol (50% v/v). Se tomó una alícuota de esa solución (0.5 µL) la cual fue mezclada en la base objetivo del laser con 2µL de una solución de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) como matriz (15 mg/mL) en una solución acuosa de etanol al 30%v/v; la gota fue secada bajo una ligera corriente de aire hasta su cristalización. El láser fue apuntado tanto en la parte central de la muestra como en las orillas del cristal, con el fin de optimizar el espectro de masas (Bahrke *et al*, 2002).

Anexo 2

2.1 Técnica para la determinación del crecimiento de cultivos bacterias con COS en microplacas.

Las cepas, Gram-negativa y Gram-positiva, fueron inoculadas en 50 mL de los medios de cultivo e incubadas durante 24h a 37°C, 30°C y 35°C para *E. coli*, *B. subtilis* y *L. plantarum*, respectivamente. De estos cultivos, 10 µL, fueron inoculados en micropozos con 200 µL de medio de cultivo consideradas como testigo. Otra serie de microplacas contenían los medios de cultivo y quitooligosacáridos (COS) en concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 g/L. El desarrollo de las bacterias fue determinada mediante densidad óptica a una longitud de onda de 595 nm, en un lector de microplaca (Bio-Tek Instruments, Inc., modelo ELx 808_U, E.U.A). Previo a la lectura de la densidad óptica, la microplaca se agitó durante 10 segundos a la máxima velocidad, en el lector de microplacas.

2.2 Análisis de varianza de los datos experimentales obtenidos con lotes de quitooligosacárido comerciales y tres diferentes cepas de bacterias.

Donde: DO es Densidad Óptica

- *Lactobacillus plantarum* vs Concentraciones del lote C1

ANDEVA

DO

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.040	4	.010	44.368	.000
Intra-grupos	.002	10	.000		
Total	.042	14			

DO

HSD de Tukey

OligoC1	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
2.00	3	.0100	
3.00	3	.0267	
1.00	3	.0433	
4.00	3		.1133
5.00	3		.1433
Sig.		.122	.181

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
 a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

- *Lactobacillus plantarum* vs Concentraciones del lote C2

ANDEVA

DO

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.763	4	.191	159.028	.000
Intra-grupos	.012	10	.001		
Total	.775	14			

DO

HSD de Tukey

OligoC2	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
1.00	3	-.3300		
2.00	3		.1167	
3.00	3			.2133
4.00	3			.2433
5.00	3			.2900
Sig.		1.000	1.000	.122

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
 a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

- *Bacillus subtilis* vs Concentraciones del lote C1

ANDEVA

DO

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.004	4	.001	8.250	.003
Intra-grupos	.001	10	.000		
Total	.005	14			

DO

HSD de Tukey

OligoC1	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
2.00	3	-.0067	
1.00	3		.0233
3.00	3		.0300
4.00	3		.0333
5.00	3		.0400
Sig.		1.000	.393

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
 a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

• *Bacillus subtilis* vs Concentraciones del lote C2

ANDEVA

DO

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.123	4	.031	121.224	.000
Intra-grupos	.003	10	.000		
Total	.125	14			

DO

HSD de Tukey

OligoC2	N	Subconjunto para alfa = .05			
		2	3	4	1
1.00	3	.0633			
2.00	3	.0733	.0733		
3.00	3		.1067		
4.00	3			.1967	
5.00	3				.3033
Sig.		.934	.151	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

• *Escherichia coli* vs Concentraciones del lote C1

ANDEVA

DO

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.001	4	.000	2.433	.116
Intra-grupos	.001	10	.000		
Total	.002	14			

DO

HSD de Tukey

OligoC1	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
5.00	3	.0067	
4.00	3	.0100	
2.00	3	.0133	
3.00	3	.0167	
1.00	3	.0300	
Sig.		.098	

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
 a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

• *Escherichia coli* vs Concentraciones del lote C2

ANDEVA

DO

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.438	4	.109	38.803	.000
Intra-grupos	.028	10	.003		
Total	.466	14			

DO

HSD de Tukey

OligoC2	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
5.00	3	.0033	
4.00	3	.0300	
3.00	3	.0367	
2.00	3	.0400	
1.00	3		.4533
Sig.		.910	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
 a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

2.3 Técnica para calcular la tasa específica de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* en microplacas.

Ésta se realizó usando como control puro medio de cultivo (200 μ L de MRS) inoculado con 10 μ L del lote de células que llamamos madre, en microplacas, y se procedió como se describió en el punto 2.1 de este anexo, pero tomando lectura de la densidad óptica (DO) cada 3 h, hasta un tiempo final de 24 h. Ajustando los valores experimentales obtenidos con la ecuación exponencial usando el programa Origin 7.0 SR0:

$$y(t) = ae^{(bt)}$$

donde y es el número de células (X_t en ufc/mL) a determinado tiempo, a es el valor inicial (X_0 en ufc/mL), b es la velocidad específica de crecimiento (μ_{max} en h^{-1}).

ANEXO 3

3. Técnicas para la caracterización de los materiales funcionalizados

Técnica colorimétrica con ninhidrina para la determinación del contenido de nitrógeno presente en el textil funcionalizado: La ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno, $C_9H_6O_4$) es un químico usado comúnmente para detectar amoníaco o grupos aminos primarios y secundarios. Cuando reacciona con grupos amino libres se observa un color púrpura azulado conocido como Ruhemann púrpura; cuando estos no están libres o están enlazados, no hay coloración.

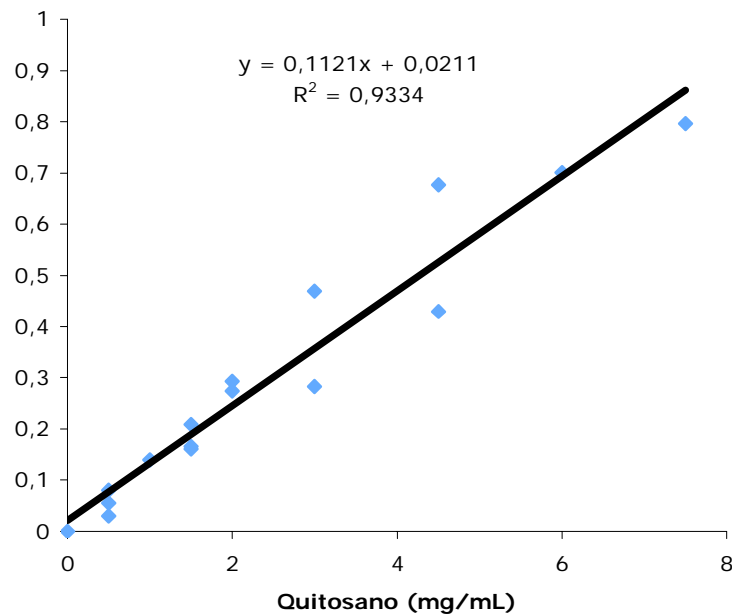
Esta coloración se logra por una reacción en donde la amina es condensada con una molécula de ninhidrina dando lugar a una base de Schiff, por lo que sólo el amoníaco y las aminas primarias pueden seguir reaccionando después de este paso. En dicho paso debe haber un protón alfa para transferirse a la base de Schiff, por lo que una amina adyacente a un carbón terciario no puede ser detectada con esta técnica. La reacción de ninhidrina con aminas secundarias da una sal imínica, que es una imina substituida cuya estructura general es: $RR'C=NR''$, donde R'' puede ser un H o un grupo orgánico (Kaiser, 1970).

En este trabajo se utilizó esta técnica para la determinación cuantitativa del contenido de nitrógeno proveniente del grupo amino del quitosano entrecruzado en el textil de celulosa, y se realizó como se describió en la metodología del capítulo 9, y como se describe a continuación:

Las muestras tratadas de textil de celulosa funcionalizada y textil de celulosa cruda (como control) fueron pulverizadas manualmente con tijeras de metal hasta un tamaño de partícula de aproximadamente 1 mm, las cuales se agregaron de una en una (0.05 g de cada muestra), a 1 mL de agua destilada en tubos de ensaye con rosca. Posteriormente se adicionó 1 mL de solución de ninhidrina a pH 5.8 (Beckman Coulter, E.U.A), la cual se preparó adicionando 0.665 g del polvo de ninhidrina a 25 mL del líquido de ninhidrina tal cuál fue proveído por el fabricante (Beckman Coulter, E.U.A) en un frasco limpio y seco de color ámbar, se agitó y se burbujeó con nitrógeno en gas durante 10 segundos.

La mezcla de muestra de celulosa y solución de ninhidrina, en los tubos de ensaye cerrados, fue colocada en un baño de agua hirviendo por 10 min, pasado este tiempo se retiró del baño caliente y se pasó a un baño de agua con hielos. Una vez hecho esto, se agregaron 5 mL de etanol al 50% v/v en cada muestra y se agitaron en un vórtex por 5 segundos.

Posteriormente, cada muestra fue filtrada con papel filtro Whatman No.40. Al filtrado se le determinó su absorbancia a una longitud de onda de 570 nm (Jenway 6305, UK). La concentración de quitosano fue calculada con base en la curva de calibración de quitosano en solución de 0.1 a 1.5% p/v en ácido cítrico al 4% p/v. Para la cual se agregó 1mL de cada una de estas diluciones en tubos de ensaye con rosca; luego se les agregó 1 mL de la solución de ninhidrina y se repitió el procedimiento explicado anteriormente. La curva obtenida se presenta a continuación.



3.a. Curva de calibración de quitosano usada para la determinación colorimétrica del nitrógeno con ninhidrina.

Microscopía electrónica de barrido (SEM): Se usó para observar los cambios morfológicos en los textiles de celulosa debido a su funcionalización; las muestras, para ser observadas en el microscopio, fueron colocadas en plataformas de acero inoxidable de 1 cm de diámetro, cubiertas con carbón con un equipo evaporador de carbón, seguido de un recubrimiento de la muestra con oro con la ayuda de un equipo de "Sputter".

Cuando las muestras tenían textiles "vivos" como microorganismos, llevaron un tratamiento diferente antes de ser colocadas en las plataformas de acero inoxidable. Éstas se colocaron en tubo eppendorf de 2 mL y se les agregó glutaraldehído para fijar las estructuras celulares, éste fijador se retiró con lavados con un amortiguador de fosfatos (pH7) hasta eliminar el aroma "a fruta verde"; una vez eliminado el aroma, se agregó a la muestra tetraóxido de osmio, OsO_4 , también con la finalidad de fijar las moléculas de grasa y otros componentes de la pared celular y evitar su daño al secado. El OsO_4 se dejó durante 2 horas y se procedió con el secado de la muestra con etanol, con el fin de eliminar el agua de la muestra e ir la sustituyendo con el etanol; para esto, primero se agrega etanol al 20% v/v, suficiente para cubrir la muestra; se deja 1h y se retira con la ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio limpia y se vuelve a agregar suficiente etanol al 20% v/v para cubrir la muestra y se deja otra hora. Se hicieron 2 lavados con etanol cada hora, aumentando la concentración de etanol en un 10% en cada par de lavados hasta llegar a etanol absoluto.

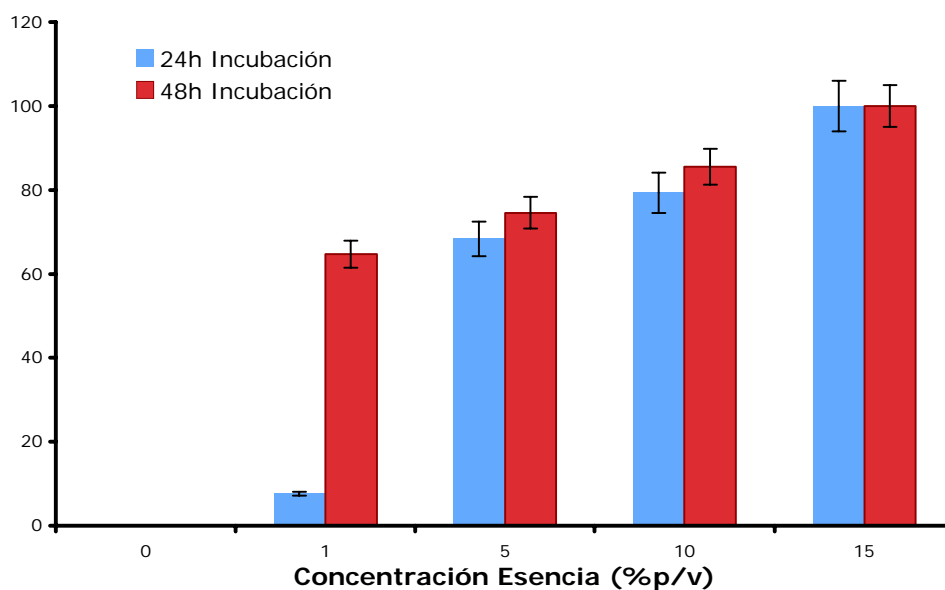
Una vez teniendo la muestra en etanol absoluto, se procedió con el secado en punto crítico, el cual es un sistema líquido/gas (CO_2 líquido/ CO_2 gas), su temperatura crítica y la presión asociada con esta temperatura; es decir, hay un punto T_c y P_c menor en el diagrama de fases T,P. Sobre la temperatura crítica, T_c , el sistema es siempre gaseoso y no puede ser licuado por la aplicación de presión. La transición de líquido a gas en el punto crítico ocurre sin una interfase porque las densidades de líquido y gas son iguales en este punto. Si el textil está totalmente inmerso en un líquido por debajo de su punto crítico, y el líquido es entonces llevado a una temperatura y presión por arriba del punto crítico, entonces, la muestra está inmersa en gas (es decir, está "seca"), sin estar expuesta a las fuerzas de tensión de superficies que la pueda dañar.

Para llevar a cabo este procedimiento a una presión y temperatura adecuadas, es normal reemplazar el agua (que tiene un punto crítico muy alto) con otro líquido, antes de

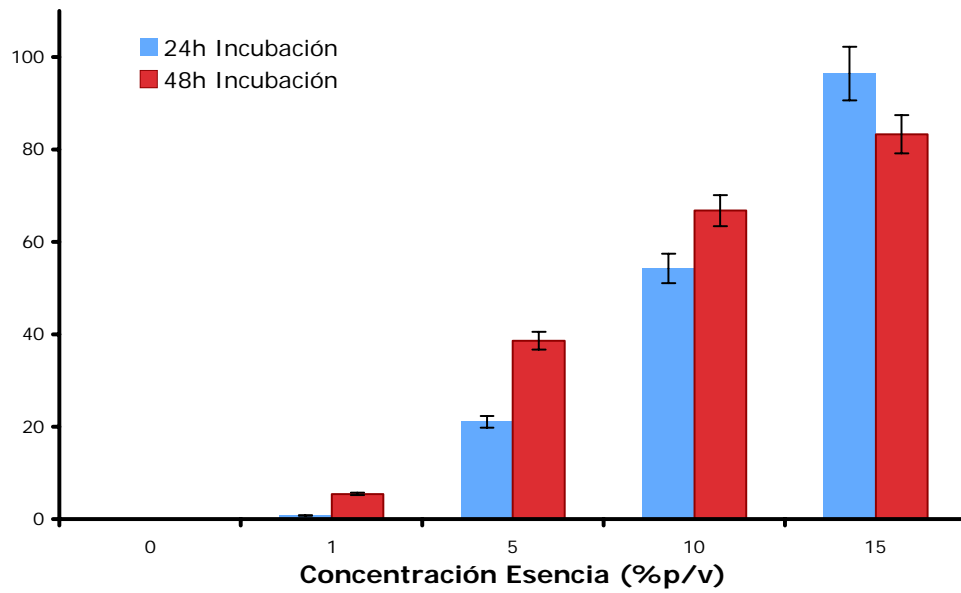
efectuarse el secado. Por eso se usó etanol. Después de la corrida de secado, se libera la presión y el textil seco puede entonces metalizarse (con carbón y oro como se describió) antes de ser colocado dentro del SEM para su observación (Sahagún, 1997).

Anexo 4

Determinación de la concentración de aceite esencial de toronja a ser encapsulado en quitosano considerando el porcentaje de inhibición de bacterias: Se realizó la evaluación del crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis*, por su inoculación en placas con medio nutritivo en sólido, al cual antes de cuajar se le agregó el aceite esencial de toronja, teniendo dos placas por cada concentración (0, 1, 5, 10 y 15%p/v) para cada una de las bacterias, en cada placa se inoculó 0.1mL de células con una concentración de 2×10^4 ufc/mL de *E.coli* y 3.8×10^5 ufc/mL de *S.epidermidis*, todas se incubaron a 37°C y se hizo la cuenta de células a las 24 y a las 48 h, en base a estas cuentas se realizaron los cálculos para determinar el porcentaje de inhibición con la ecuación 4.



4. a. Porcentaje de inhibición de *Escherichia coli* con aceite esencial de toronja a varias concentraciones.



4.b. Porcentaje de inhibición de *Staphylococcus epidermidis* con puro aceite esencial de toronja a varias concentraciones.

La selección de la concentración se llevó a cabo considerando un 100% de inhibición de la bacteria de hasta por 48h.