

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD QUERETARO

**CINVESTAV I.P.N.
SECCION DE INFORMACION
Y DOCUMENTACION**

**“Estudio de las interacciones moleculares del sistema Quitosan-
Caseinato de Sodio”**

Tesis que presenta

Rocío Nohemí Rivas Araiza

para obtener el Grado de

**Maestra en Ciencias
En la Especialidad de**

Materiales

Director de la tesis:

Dr. J. Gabriel Luna Bárcenas

Codirectora de la tesis:

Dra. Ma. Cristina Irma Pérez Pérez

**CINVESTAV
IPN
ADQUISICION
DE LIBROS**

Santiago de Querétaro, Qro. Marzo 2005

CLASIF.: TA 404.2.R58 2005
ADQUIS.: SSI-055
FECHA: 16-DIC-2005
PROCED.: DON.-2005
\$

I.D. 121859-1001

“Ciencia sin conciencia no es más que la ruina del alma”

François RABELAIS

Con mucho cariño y amor dedico este trabajo a....

A MIS PADRES (Jesús Rivas y Matilde Araiza)

Y HERMANOS (Gerardo, Edgar y Erik)

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación, se realizó gracias a la valiosa participación y apoyo de un grupo de personas muy importante para mí, que no sólo me permitió crecer en el aspecto académico sino también profesional y personal. De una manera muy especial agradezco a cada uno de ustedes.

- Agradezco al CINVESTAV-Unidad Querétaro por otorgarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.
- Agradezco al Dr. Gabriel Luna por dirigir tan certeramente este trabajo, así como por su incondicional apoyo y confianza.
- Agradezco a la Dra. Cristina Pérez Pérez por colaborar en la dirección de este proyecto. Gracias por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias.
- Agradezco al Dr. Sergio M. Nuno Donlucas de la Universidad de Guadalajara y al Dr. Antonio Martínez Richa de la Universidad de Guanajuato por colaborar tan activamente en la realización de pruebas de caracterización.
- Agradezco al Dr. Fernando Martínez Bustos y al Dr. Sergio Jiménez Sandoval por sus enseñanzas y valiosos comentarios sobre el proyecto.
- Agradezco a Elizabeth Lima y Susana Altamirano por su apoyo en la realización de diferentes pruebas en el Tecnológico de Celaya.
- A mis compañeros de generación y amigos: Bárbara, Cuauhtémoc, Álvaro, Víctor, Omar, Arturo, Irvin, Paco, Nelly, Rodrigo.
- Agradezco a Araceli Mauricio, Mary Carmen Delgado, Juan José Veles, Marcela Gaytan., Martín Hernández, Eleazar Urbina por su apoyo en la pruebas de caracterización así como a Raquel R. por su ayuda en trámites administrativos.

Agradezco al CONACyT por su apoyo a través de su beca-crédito 171545, para realizar mis estudios de maestría. Proyectos de CONACyT J33262, NSF-CONACyT 39377 y 42728, así como al CONCyTEQ 106/02 Ref. No. 22 Acta 24/06/02

INDICE

	Página
INDICE	i
INDICE DE FIGURAS	iii
INDICE DE CUADROS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCION	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Antecedente y justificación	3
1.3 Fundamentos teóricos	5
1.3.1 Enlaces no covalentes	5
1.3.2 Formación de complejos polielectrolitos	8
1.3.3 Preparación de películas por “casting” o moldeado	10
1.3.4 Quitosan (QTS)	10
1.3.5 Caseinato de sodio (CS)	14
1.3.6 Mezcla de biopolímeros: QTS y CS	18
1.3.7 Entrecruzamiento químico	19
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	21
2.1 Hipótesis	21
2.2 Objetivo General	21
2.3 Objetivos Específicos	21
3. MATERIALES Y METODOS	22
3.1 Materiales	22
3.2 Preparación de soluciones filmogénicas	22
3.3 Fabricación de películas	22
3.4 Caracterización de películas	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM)	27
4.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)	29

4.3 Espectroscopia de infrarrojo (IR)	34
4.4 Difracción de rayos X (XRD)	41
4.5 Análisis termogravimétrico (TGA)	46
4.6 DSC modulado	50
4.7 Fuerza a la punción	53
4.8 Fuerza a la tensión y porcentaje de elongación (%E)	56
4.9 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)	59
5. CONCLUSIONES	64
6. PERSPECTIVAS	67
7. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	68

INDICE DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
1	Esquema gráfico de enlaces no covalentes en proteínas (Puentes salinos, puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals).	6
2	Un polielectrolito, (Ej. QTS), se expande porque sus cargas se repelen mutuamente.	10
3	Estructura química de quitina y QTS.	11
4	Derivados de la quitina y QTS.	12
5	Estructura química del QTS en forma salina.	13
6	Estructura química del glutaraldehído (GTA).	20
7	Micrografías de películas (5000X).	28
8	Espectro ^{13}C -RMN de QTS y CS.	29
9	Estructura química del QTS.	30
10	Espectro ^{13}C -RMN de película QTS- CS.	31
11	Espectro ^{13}C -RMN de QTS- CS -GTA.	32
12	Variaciones de los desplazamientos químicos de los carbonos C-1, C-2, C-3/C-6 y C=O.	33
13	Espectro infrarrojo en la película de CS y de QTS en hojuela.	34
14	Espectro infrarrojo en películas QTS-CS y QTS-CS con glicerol (GLI).	37
15	Banda amida I y amida II de película QTS- CS.	38
16	Espectro infrarrojo en películas QTS-CS-GTA y QTS-CS-GLI-GTA.	39
17	Banda amida I y amida II de película QTS-CS-GTA.	40
18	Reacción entre QTS, CS y GTA.	40
19	Difractograma R-X de película de QTS en hojuela.	42

20	Difractograma R-X de película de película a base de QTS.	43
21	.Difractograma de película R-X de película de QTS lavada.	44
22	Difractograma R-X de CS polvo y CS película.	44
23	Difractograma R-X de QTS-CS y QTS-CS–GLI.	45
24	Difractograma R-X de QTS- CS -GTA y QTS- CS -GLI-GTA.	46
25	Termograma de películas QTS-CS, QTS-CS-0.25%GTA y QTS-CS-GLI-0.25%GTA.	47
26	Termogramas diferenciales de películas.	48
27	Fuerza a la punción de las películas.	54
28	Porcentaje de elongación de películas y fuerza a la tensión de películas.	57
29	Permeabilidad al vapor de agua (PVA) a través de las diferentes películas preparadas.	62

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Nombre	Página
1	Grupos funcionales formadores de puentes de hidrógeno	7
2	Propiedades físicas y composición de CS.	18
3	Formulaciones para la preparación de películas	23
4	^{13}C desplazamiento químicos (δ) del CS (ppm desde TSM).	29
5	Desplazamiento químicos (δ) ^{13}C del QTS.	30
6	Identificación de grupos funcionales de espectros IR de películas a base de QTS.	35
7	Identificación de grupos funcionales de espectros IR de películas de CS.	36
8	Características termogravimétricas (TG) de películas.	47
9	Temperaturas de los diagramas DTG.	49
10	Temperatura de transición vítrea (T_g).	51
11	Fuerza a la punción de películas	53
12	Comparación de fuerza a la punción de películas elaboradas a base de biopolímeros..	56
13	Comparación de fuerza a la tensión de películas de empaque sintéticas y de películas elaboradas a base de biopolímeros.	59
14	Espesor de películas elaboradas a base de QTS y CS.	60
15	Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de películas sintéticas y películas elaboradas a base de biopolímeros.	61

RESUMEN

Con el avance del conocimiento de las interacciones presentes en el sistema quitosan-caseinato de sodio (QTS-CS) se pretendió aprovechar las propiedades de ambos biopolímeros para fabricar una película biodegradable e insoluble en agua. En busca del mejoramiento de las propiedades mecánicas de las películas QTS-CS se adicionó glutaraldehído (GTA), como agente entrecruzante, con dos niveles de concentración 0.25% y 0.50% (w/w). Mediante espectroscopia de RMN e IR se detectó la formación de puentes salinos y puentes de hidrógeno entre el QTS-CS. Por su parte, el GTA favoreció el entrecruzamiento entre ambos biopolímeros, lo que provocó modificaciones localizadas en el C-2 y C-3/C-6 de la unidad estructural del QTS. Con el uso de microscopia electrónica de barrido (SEM) se encontró que las películas estaban constituidas por gránulos de forma irregular. Con difracción de rayos X (XRD) se observó que tanto las películas de QTS-CS como las películas de QTS-CS-GTA fueron amorfas. Las películas QTS-CS fueron térmicamente menos estables que sus componentes individuales. En cambio, la adición de 0.50% (w/w) de GTA incrementó la temperatura de degradación (278.71 °C). La temperatura de transición vítrea (T_g) de las películas QTS-CS fue de 168 °C. No obstante, la mezcla de QTS-CS-0.50% (w/w) GTA presentó la T_g más alta (179.37 °C). En comparación con las películas de QTS y CS (67.27 y 106.40 N/mm, respectivamente), las fuertes interacciones químicas entre QTS-CS mejoró la fuerza a la punción de las películas (123.30 N/mm) aunque éstas mostraron baja fuerza a la tensión (2.51 MPa) y poca flexibilidad (35.17 %E). La adición de GTA no mejoró las propiedades mecánicas del sistema debido a la discontinuidad de la red polimérica. Las películas de QTS-CS y QTS-CS-GTA fueron más permeables al vapor de agua que sus componentes individuales (desde 5.29×10^{-12} hasta 6.13×10^{-12} mol.m.m⁻².s⁻¹.Pa⁻¹).

PALABRAS CLAVE: *quitosa, caseinato de sodio, puentes salinos, puentes de hidrógeno, fuerza a la punción.*

ABSTRACT

Chitosan (QTS) and sodium caseinate (CS) are two biopolymers that are biodegradable with significant potential in the food industry and medicine. In this work, favorable molecular interactions among both biopolymers were advantageously used to prepare a water insoluble film. To improve mechanical properties of the QTS-CS film, glutaraldehyde (GTA), a crosslinking agent, was added in two concentrations: 0.25% and 0.50% (w/w). By means of ^{13}C -NMR and IR spectroscopies, the formation of salt bridges and hydrogen bonds in the QTS-CS film were detected. On the other hand, GTA increases crosslinking between the two biopolymers, causing changes located in the C-2 and C-3/C-6 positions of the QTS structural unit. Optical microscopy analysis showed that the films consisted of particles of irregular shape. X-ray diffraction showed both QTS-CS and QTS-CS-GTA films were semi-crystalline. The QTS-CS films were thermally less stable than their pure components. However, the addition of 0.50% (w/w) of GTA increased the degradation temperature (278.71°C). Glass transition temperature (T_g) of QTS-CS films was approximately 168°C . However, QTS-CS-0.50% (w/w) GTA showed a higher T_g (179.37°C). In comparison with the QTS and CS films (67.27 y 106.40 N/mm), the strong chemical interactions between the QTS and CS improved the puncture strength of the films (123.30 N/mm) although these materials had a very low tensile strength (2.51 MPa) and they were poorly flexible (35.17% E). Addition of the crosslinking agent GTA did not enhance the mechanical properties of QTS-CS system because of the discontinuity of the polymeric network. QTS-CS and QTS-CS-GTA films had higher values of water vapor permeability than their pure components (5.29×10^{-12} to 6.13×10^{-12} mol.m.m $^{-2}$.s $^{-1}$.Pa $^{-1}$).

Key words: chitosan, sodium caseinate, salt bridges, hydrogen bounds, puncture strength.

1. INTRODUCCION

1.1 Generalidades

Los biopolímeros son polímeros que son generados a partir de recursos naturales renovables, son frecuentemente biodegradables y no tóxicos. Estos pueden ser producidos por sistemas biológicos (*Ej.* microorganismos, plantas y animales), o sintetizados químicamente a partir materiales biológicos (*Ej.* azúcar, almidón, grasas naturales, aceites, etc.)

La mezcla de biopolímeros es uno de los métodos más efectivos para obtener nuevos materiales poliméricos con propiedades biológicas y mecánicas deseables. En la fabricación de estos materiales se debe considerar la compatibilidad de los biopolímeros a mezclar dado que las propiedades del producto dependen del tipo de interacción que exista entre éstos.

El buen desempeño de estos novedosos materiales ha permitido su aplicación como biomateriales. Los biomateriales están diseñados para la recuperación, aumento o reemplazo de las funciones naturales de tejidos vivos u órganos del cuerpo humano. Entre las aplicaciones específicas de los biomateriales se pueden citar: la liberación controlada de sustancias biológicas o farmacéuticas dentro del organismo vivo, parches de aplicación biomédica y soportes para el crecimiento de tejido celular.

El quitosan (QTS) tiene gran potencial como biomaterial, ya que es biodegradable, biocompatible, no tóxico, de bajo costo y en la regeneración de tejido cutáneo presenta varias ventajas debido a que puede actuar como agente hemostático, inhibe la formación de cicatrices, acelera el proceso de curación y reduce la sensación de dolor. Sin embargo, las películas de QTS no tienen propiedades mecánicas apropiadas dado que son rígidas y quebradizas [1].

El QTS se ha mezclado con biopolímeros naturales, específicamente con polisacáridos (*Ej.* la goma xantana, la celulosa, la agarosa y alginatos) y proteínas. No obstante pesar de que las proteínas son biodegradables y biocompatibles, sólo algunas se han mezclado exitosamente con QTS, tal es el caso del colágeno, gelatina y albúmina [2].

El caseinato de sodio (CS) es de bajo costo, es soluble en agua, tiene la capacidad de absorber agua y de gelificar. Se pueden formar películas a partir de la solución acuosa de CS debido a que es capaz de formar enlaces de hidrógeno y de tener interacciones electrostáticas e hidrófobas, desafortunadamente estas películas son altamente solubles en agua y quebradizas lo cual puede ser desventajoso en algunas aplicaciones [3].

Por lo anterior, el CS es candidato adecuado para mezclarse con QTS, con el propósito de obtener una película insoluble en agua que sea producto de la interacción QTS-CS.

1.2 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

Varios estudios han estado encaminados a obtener materiales elaborados a base de biopolímeros para aplicaciones biomédicas, sólo unos cuantos han mostraron grandes expectativas para su aplicación. A continuación se citan algunos de ellos.

Cheng et al. [1] demostraron que la gelatina puede ser exitosamente mezclada con QTS para preparar películas suaves, elásticas y con alta afinidad al tejido nervioso. La película exhibió un modulo de Young bajo y un alto porcentaje de elongación a la ruptura en comparación con el QTS. Sin embargo, las películas fueron altamente hidrofílicas. Estos autores concluyeron, con base en las adecuadas propiedades mecánicas y la alta afinidad en tejido nervioso, que las películas de QTS-Gelatina son un buen candidato para la regeneración de tejido.

Yan et al. [4] prepararon películas a partir del complejo polielectrolito QTS-Alginatos, las cuales mostraron una buena biocompatibilidad "*in Vitro*" con fibroblastos de ratón y humano. Desafortunadamente, éstas fueron insolubles en agua y por tanto presentaron baja permeabilidad al vapor de agua.

En cambio, Xiao et al. [5] fabricaron películas a base de QTS-Konjac con buena termoestabilidad, con alta fuerza a la tensión y de elongación (mediciones realizadas en base seca). La solubilidad en agua se mejoró por la mezcla con Konjac. Por lo tanto, de acuerdo con estos autores las películas de QTS-Konjac tienen aplicaciones potenciales como recubrimiento de antisépticos solubles en agua.

El entrecruzamiento ha sido un método empleado para mejorar las propiedades mecánicas de la mezcla de biopolímeros, tal es el caso de las películas de glutenina entrecruzadas con formaldehído (FA), glioxal (GLY) o glutaraldehído (GTA), las cuales mejoraron sus propiedades de barrera al agua, se incrementó la resistencia al rompimiento y decreció la deformación.

.....
El entrecruzamiento con FA fue el más efectivo en términos de estas propiedades. Igualmente, el GLY y el GTA mostraron mejoramiento en las propiedades mecánicas de las películas aunque presentaron una coloración amarilla indeseable[6].

Por su parte, Vaz et al. [2] elaboraron películas a base de proteína de soya, caseína, CS y gelatina entrecruzadas con GLY, ellos encontraron que se incrementó el esfuerzo mecánico y se redujo la ductilidad de las películas. Las películas de proteína de soya entrecruzadas presentaron alta estabilidad enzimática, por lo que son atractivas para aplicaciones biomédicas, ya sea para la liberación de fármacos o como andamio para la regeneración de tejidos, donde es necesario por largos periodos de tiempo.

Con base en la breve revisión bibliográfica presentada se observa que la investigación básica y aplicada ha estudiado la síntesis, la degradación y modificación de biopolímeros así como sus propiedades. Sin embargo, considerando los trabajos desarrollados durante las últimas dos décadas el conocimiento de los biopolímeros es aún escaso. Tal es el caso del sistema QTS-CS donde no hay trabajos reportados al respecto, por lo cual surgió el interés de estudiar dicho sistema mediante varias técnicas de caracterización. Con el avance del conocimiento de las interacciones presentes del sistema QTS-CS se pretendió aprovechar las propiedades de ambos biopolímeros para fabricar una película insoluble en agua y biodegradable.

1.3 FUNDAMENTOS TEORICOS

1.3.1 Enlaces no covalentes

Los enlaces no covalentes son muy importantes en cualquier actividad biológica. La energía de enlace de este tipo de interacciones es muy débil (1-15 Kcal/mol) mientras que para los enlaces covalentes la energía de enlace es mucho mayor (60-250 Kcal/mol aprox.). Por lo anterior, la energía requerida para romper este tipo de interacciones es muy pequeña y en algunas ocasiones estas interacciones aparecen y desaparecen rápidamente y espontáneamente [7].

En los sistemas biológicos existen diferentes tipos de enlaces no covalentes: interacciones iónicas o electrostáticas, puentes salinos, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas.

a) Enlace iónicos

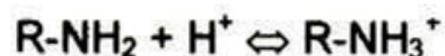
El enlace iónico se define por la atracción eléctrica entre dos átomos o grupos de átomos de carga opuesta. Un enlace puramente iónico es el NaCl, donde el átomo de sodio es electropositivo (+1) y el átomo de cloro electronegativo (-1).

b) Puentes salino

No es necesario tener compuestos puramente iónicos para observar las interacciones iónicas. Si se tiene un enlace muy polar (formado por elementos de diferente electronegatividad) es posible la formación de grupos cargados [7].

Tal es el caso en las proteínas con los grupos carboxilos (R-COOH) y aminos (R-NH₂), el carboxil pierde electrones fácilmente mientras que el amino los gana con facilidad (Figura 1).

A este tipo de interacciones se les conoce como puentes salinos [7].



Generalmente, los puentes salinos se definen como la interacción de un átomo negativo (como es el oxígeno terminal del ácido aspártico y ácido glutámico) y un átomo de carga positiva (el nitrógeno terminal de la arginina, lisina o histidina) a una distancia interatómica menor de 4 Å (Figura 1).

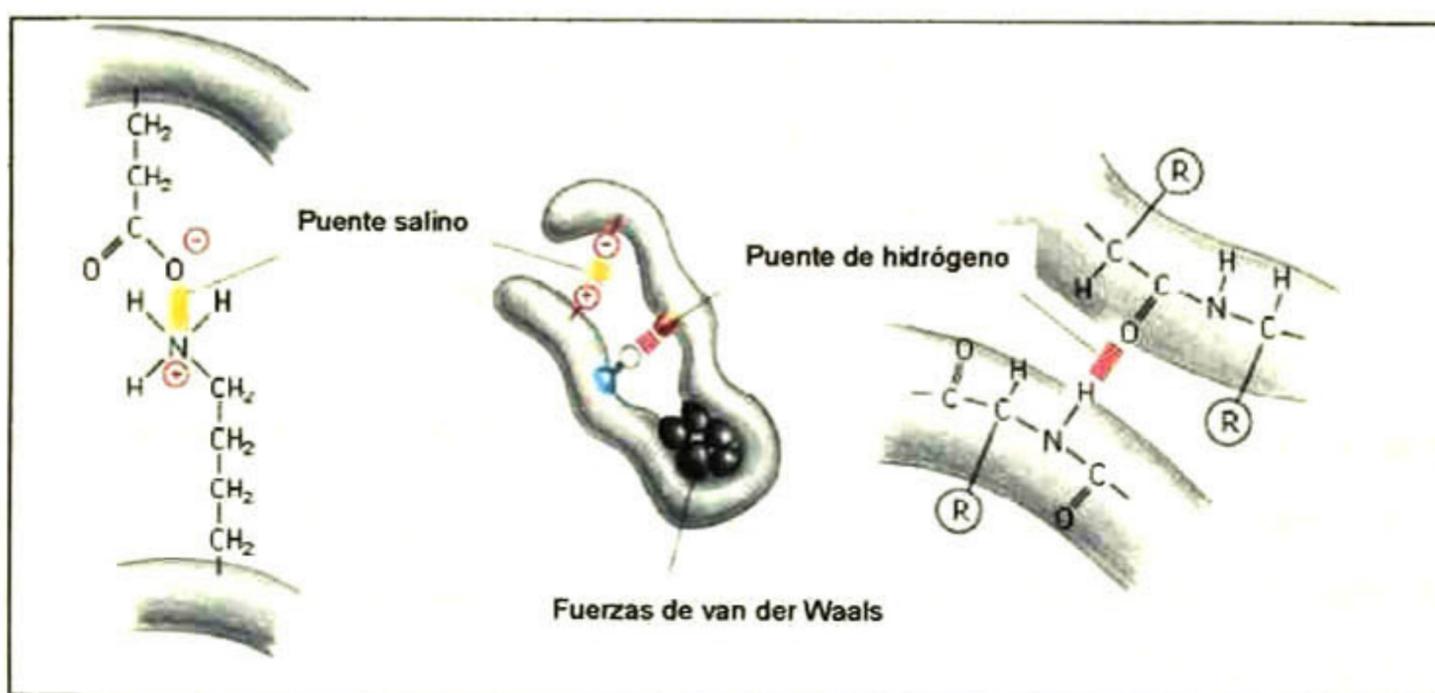


Figura 1. Esquema gráfico de enlaces no covalentes en proteínas (Puentes salinos, puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals).

c) Puentes de hidrógeno

En la formación de puentes de hidrógeno (H-enlace) se requiere de dos átomos. Un átomo donador, que contribuirá con el hidrógeno y un átomo aceptor de alta densidad electrónica (usualmente un par de electrones libres) que capturará el protón [7].

En el agua, el oxígeno actúa como donador y otra molécula de agua actúa como aceptor. Los puentes de hidrógeno no se limitan al oxígeno como átomo donador y aceptor, también existen otros grupos funcionales que pueden participar en la formación de puentes de hidrógeno (Cuadro 1), donde cualquier grupo donador puede interactuar con cualquier aceptor [7].

Cuadro 1. Grupos funcionales formadores de puentes de hidrógeno [7].

DONADOR	ACEPTOR
H-O-H	H-O-H
R-NH ₂	R-P(=O)-(OH) ₂
R-NH-C(=O)-R	R-NH-C(=O)-R
R-OH	R-OHR-O-R
R-COOH	R-COOH

Los puentes de hidrógeno son de naturaleza electrostática a pesar de que no están formados por grupos cargados. Por el contrario, los puentes de hidrógeno están constituidos por grupos parcialmente cargados, es decir, los electrones se encuentran aún presentes en los alrededores del átomo aunque con un arreglo asimétrico alrededor del átomo [7].

Los puentes de hidrógeno son direccionados puesto que existe una dirección en la cual la interacción es mayor. La máxima interacción se observa cuando los tres átomos involucrados se encuentran alineados (D-H...A), la distancia óptima entre el donador y aceptor es de aproximadamente 2.8 Å y la energía involucrada en los puentes de hidrógeno está en el intervalo de 2 a 5 Kcal/mol [7].

Cabe resaltar que los puentes de hidrógeno son muy importantes en los sistemas biológicos puesto que las proteínas presentan una gran cantidad de grupos que pueden participar en la formación de éstos.

d) Fuerzas de van der Waals

Hasta este momento se ha comentado de las interacciones entre átomos cargados y átomos parcialmente cargados. Sin embargo, cuando dos átomos neutros se encuentran juntos, las nubes electrónicas de cada átomo comienzan a interactuar entre si y el resultado es la deformación de ambas nubes debido a la repulsión electrónica. Esta deformación provoca una asimetría en la nube electrónica, esto es, una distribución irregular de carga que resulta en un pequeño dipolo transitorio. A éstas débiles interacciones atractivas se le conoce como interacciones de van der Waals (Figura 1). El perfil energético de las interacciones de van der Waals es muy similar al perfil de los puentes de hidrógeno, aunque con un nivel de energía inferior (desde 0.5 hasta 1 Kcal/mol).

e) Interacciones hidrofóbicas

Las interacciones hidrofóbicas son provocadas por la tendencia de grupos no polares a agregarse para protegerse entre ellas del contacto con moléculas polares, es decir, las interacciones hidrofóbicas son producto de las fuerzas que minimizan el contacto de moléculas no polares (*Ej.* lípidos) con moléculas polares (*Ej.* agua).

1.3.2 Formación de complejos polielectrolitos

Un polielectrolito es un polímero con grupos ionizables a lo largo de su cadena estructural. Las interacciones entre dos polielectrolitos de carga opuesta permiten la formación de una **polisal** o **complejo polielectrolito** que tiene propiedades muy diferentes a sus componentes individuales [8].

Los complejos polielectrolitos son separados de la solución ya sea como precipitado floculado con el cual se pueden formar películas o como complejo coacervado. El complejo coacervado es una fase líquida rica en polímero que se separa de la solución. Ambos polímeros son colectados conjuntamente en una fase mientras que la otra fase consiste completamente de disolvente [8].

De lo anterior, se tiene que la coacervación es una etapa intermedia entre disolución y precipitado; es decir, conlleva una desolvatación parcial en contraposición a la desolvatación exhaustiva asociada al proceso de precipitación [9]. El término de *coacervación simple* se confiere a polímeros no ionizables, este proceso se favorece por cambios en las condiciones de solvatación (modificación de pH, de temperatura y de fuerza iónica) o por la evaporación de disolvente que produce un aumento de la concentración del biopolímero que permite obtener una red tridimensional [3].

Debido a que las interacciones entre polielectrolitos son principalmente electrostáticas una serie de factores están involucrados en la formación de los complejos polielectrolitos: el tipo de carga y la densidad de carga del polielectrolito, la fuerza iónica y la valencia de los iones así como el pH y la temperatura [8].

Mientras que los polielectrolitos individuales son solubles en agua, los complejos provenientes de polielectrolitos fuertes usualmente son insolubles en medios acuosos y pueden absorber grandes cantidades de agua así como mantener altas propiedades mecánicas aún cuando se encuentran hinchados en agua. El complejo polielectrolito con una composición equimolar es neutro mientras que con una composición no equimolar es sensible a los cambios de pH, por lo cual éstos pueden ser solubles en soluciones acuosas ácidas o alcalinas [8].

Se pueden formar películas a partir de los complejos polielectrolitos mediante el proceso de moldeado o "casting" de la solución, seguido por la evaporación de disolvente y por un lavado con agua.

1.3.3 Preparación de películas por “casting” o moldeado

La preparación de películas por “casting” o moldeado es el método más empleado en la producción de biomateriales y consiste en preparar una dispersión filmogénica de los biopolímeros en un disolvente apropiado, seguido de una deshidratación sobre una superficie lisa. En este proceso se destruye la estructura nativa del biopolímero debido al proceso de solubilización del material (Figura 2).

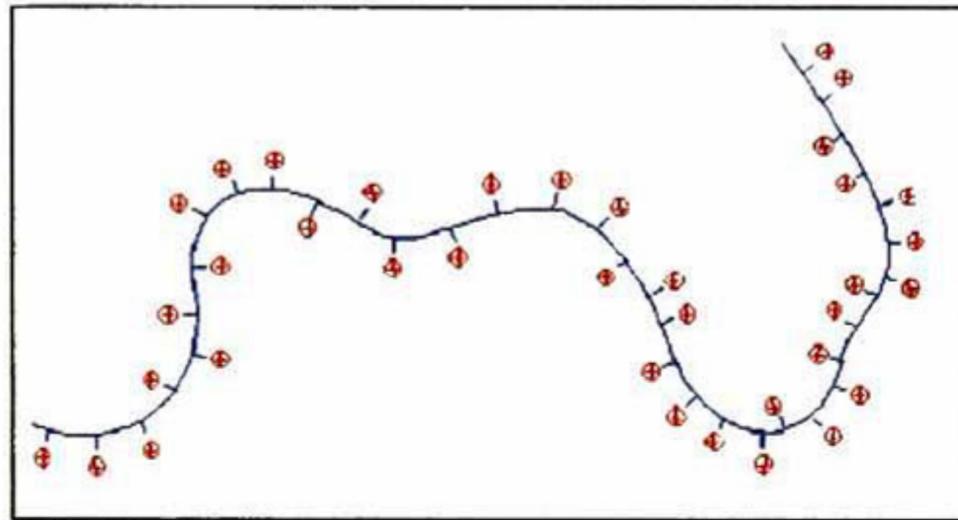


Figura 2. Un polielectrolito, (Ej. QTS), se expande porque sus cargas se repelen mutuamente.

En la preparación de las películas se debe considerar la temperatura de evaporación puesto que una temperatura excesiva provoca una rápida evaporación del disolvente lo que inmoviliza prematuramente las moléculas del biopolímero antes que estas hayan fusionado en una película lisa y continua [3].

1.3.4 Quitosan (QTS)

La quitina, biopolímero natural, es el segundo componente orgánico más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Se encuentra formando parte de la cutícula de muchos invertebrados, como componente de los caparzones en los crustáceos, en exoesqueletos de insectos, en la pared celular de hongos y levaduras, en la micro fauna y plancton [10].

El QTS es el producto de la desacetilación parcial de la quitina, es decir, se remueve el grupo acetilo presente en la quitina.

Estructura química

Estructuralmente el QTS es un polisacárido lineal que consta de residuos de D-glucosamina con enlace β (1 \rightarrow 4) con un número variable de grupos N-acetilglucosamina localizados al azar [11].

En la Figura 3 se muestra la estructura química de la quitina y del QTS.

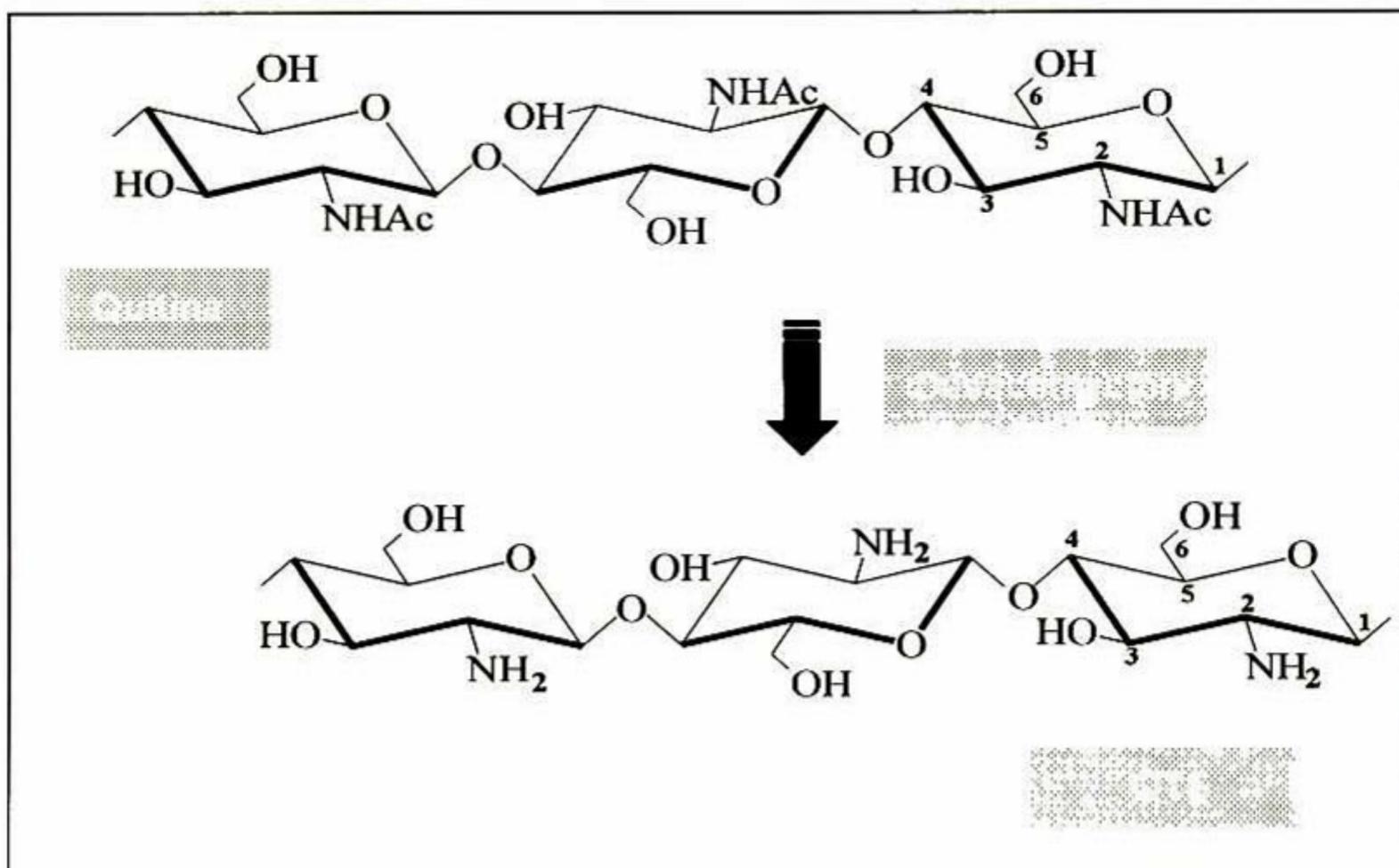


Figura 3. Estructura química de quitina y QTS.

Dependiendo de la fuente comercial y del procedimiento de preparación, el QTS puede tener un peso molecular promedio desde 50 hasta 1000 kDa. Existen preparaciones comerciales de QTS con diferentes grados de desacetilación, con un intervalo desde 50 a 90% de desacetilación [12].

Propiedades del QTS

El QTS es un polímero semi-cristalino y su porcentaje de cristalinidad está en función del grado de desacetilación. La cristalinidad es máxima para la quitina (0% de desacetilación) y cuando está completamente desacetilado el QTS.

La mínima cristalización se observa a grados intermedios de desacetilación. A causa de la estructura cristalina que es estable, el QTS es normalmente insoluble en soluciones acuosas con pH mayores de 7. Sin embargo, en ácidos diluidos, los grupos amino son protonados y las moléculas son totalmente solubles a pH menores de 5 [12].

La presencia de los grupos funcionales $-OH$ y $-NH_2$ en la estructura de QTS permite su modificación química y por tanto la obtención de una diversidad de derivados. La Figura 4 detalla algunas modificaciones químicas de quitina y QTS [13].

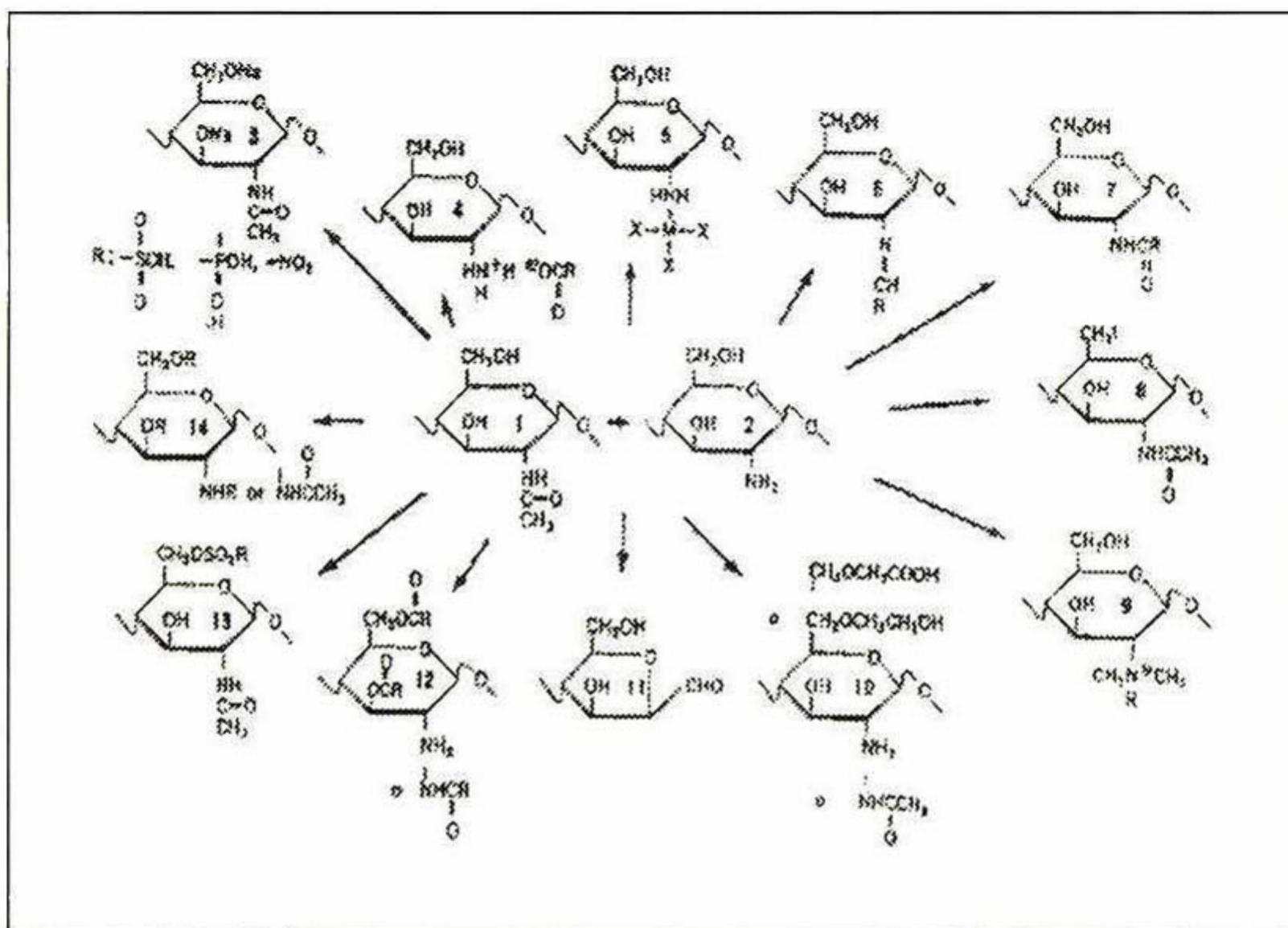


Figura 4. Derivados de la quitina y QTS [13].

Películas de QTS

El QTS posee la habilidad de formar sales con ácidos orgánicos debido a la presencia de grupos aminos libres (Figura 5) [14].

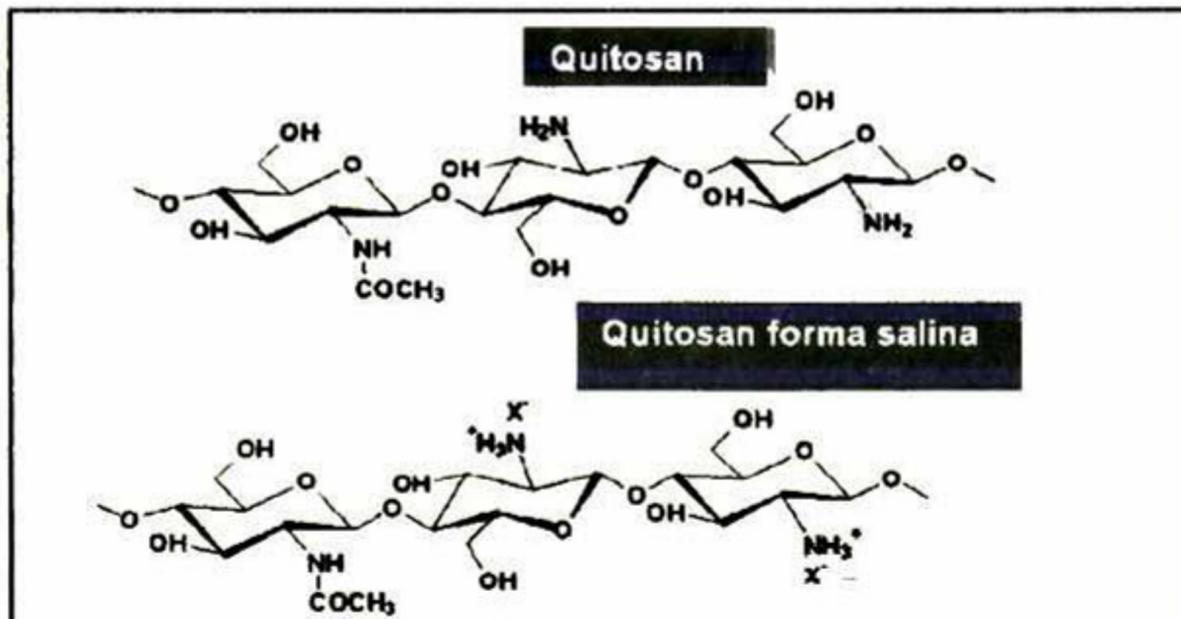


Figura 5. Estructura química del QTS en forma salina.

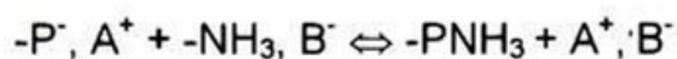
Si se prepara una película a partir de una solución de QTS en ácido acético, el sólido obtenido después de la evaporación se encuentra parcialmente en forma de acetato y si se deja la película de QTS expuesta a condiciones ambientales, después de varios días los grupos aminos libres han sido completamente regenerados. Este comportamiento se atenúa con la utilización de ácidos carboxílicos de alto peso molecular [15].

En el caso de un ácido fuerte, la sal es muy estable y difícilmente es desplazada, aunque en el caso de ácidos débiles como el ácido acético, la sal no es formada completamente y por tanto puede ser desplazada especialmente en presencia de un ácido fuerte o por simple eliminación de los ácidos libres [15].

Formación de complejos polielectrolitos con QTS

Los polímeros policationicos son particularmente raros en la naturaleza y por tanto el QTS es un material de valiosa importancia para la elaboración de complejos polielectrolitos.

En general, la formación de los complejos polielectrolitos dependen esencialmente de la densidad de carga de cada polímero y de la pK_o de los diferentes sitios iónicos, por consecuencia, la máxima complejación ocurre cuando las *densidades de carga son máximas*. En estas condiciones la formación completa de la formación de los complejos es lograda cuando la cantidad total de cargas negativas es exactamente neutralizada por la misma cantidad de los grupos amonio del QTS ($-NH_3^+$). En este punto, el medio contiene el complejo que es eléctricamente neutro e insoluble en agua así como la sal AB que es liberada durante la interacción de los polielectrolitos [15].



La estabilidad del complejo depende de la pK_o de los grupos aniónicos y catiónicos. Esto es, cuando un sitio iónico corresponde a un ácido carboxílico débil, el complejo formado es fácilmente destruido cuando se incrementa el pH. Este comportamiento explica porque el complejo polielectrolito es ligeramente formado cuando el QTS en su forma salina es adicionado a una solución que contiene un polianión débil. Por el contrario, cuando los sitios aniónicos corresponden a un ácido fuerte como los sulfatos los sitios iónicos siempre están protonados sin importar el pH y como consecuencia se obtiene un complejo estable incluso a pH bajos [15].

1.3.5 Caseinato de sodio (CS)

La caseína es la principal proteína de la leche, representa el 80% de la proteína total [16]. Esta proteína consiste de cuatro pequeños fragmentos peptídicos: α_{s1} - (38%), α_{s2} - (10%), β - (36%) y κ -caseína (13%), los cuales varían en hidrofobicidad y peso molecular (19 000-23 900). La caseína esta presente en la leche en forma de micelas que están estabilizadas por iones de calcio, fosfato de calcio coloidal o citrato y por una capa de κ -caseína, aunque éstas pueden precipitar por reacción enzimática de κ -caseína o por simple precipitación ácida [17].

Las micelas de caseína consisten de 93% de proteína y 7% de materiales inorgánicos, principalmente calcio y fosfato [18]. Estas micelas son complejos coloidales de proteína y sales que tiene la función biológica de transportar y liberar eficientemente la proteína, el calcio y fósforo al neonato [19].

El CS es preparado por la precipitación ácida de la caseína en su punto isoeléctrico ($pI=4.6$). Una vez realizada la precipitación, a la caseína ácida se le adiciona NaOH para redissolver la proteína y restaurar el medio a neutralidad [20]. De forma general, las caseínas ácidas puede ser tratadas con una solución alcalina (generalmente NaOH, KOH, $Mg(OH)_2$ y $Ca(OH)_2$ a 80-90 °C y pH 6.2-6.7, para posteriormente pasteurizar y secar los caseinatos formados [3].

En condiciones neutras, las caseinatos forman *agregados* o *submicelas* debido a su alto contenido de aminoácidos hidrófobos que se asocian mutuamente en soluciones acuosas. Las asociaciones posteriores de las submicelas para formar nuevamente las micelas de caseína son impedidas debido a la remoción de la mayor cantidad de calcio [20].

Esto es, con el tratamiento ácido de la leche se remueve el fosfato de calcio coloidal que esta ligado a las submicelas lo que resulta en una mayor movilidad de la molécula de caseína aunque el proceso de coagulación ocurre antes que las micelas se agreguen nuevamente [17].

Las caseínas son un grupo de proteínas inusuales, puesto que su conformación no es globular ni fibrosa. A pesar de su alto contenido de aminoácidos hidrófobos, las caseínas son descritas por una estructura al azar con pequeñas cantidades de estructuras secundarias, a pesar de que estas presentan un alto contenido de prolina. En contraposición, estudios de elipsometría han demostrado que el CS en solución acuosa con sorbitol presenta una estructura secundaria más ordenada y por consecuencia una estructura más compacta [21].

Propiedades de los caseinatos

Las principales propiedades del CS son: la capacidad emulsificante, la absorción de agua, la captación de grasas, la gelatinización, la función como agente espesante y estabilizante [22]. Estas propiedades son sensibles a cambios de pH y en algunos casos por la interacción entre los parámetros pH y temperatura [23].

Uno de los efectos del pH en los caseinatos es el grado de solubilización, es decir, la solubilidad de CS en agua es máxima en el intervalo de pH 6.5-8 y es mínima en pH 3.8-5.8. En tales condiciones la solubilidad es mínima debido a la cercanía del punto isoeléctrico de la caseína ($pI=4.6$). A pesar de que el CS presenta baja cerca de su punto isoeléctrico, las propiedades fisicoquímicas de las fracciones solubles se incrementan considerablemente, lo cual no se observa a pH 6-8 y pH 3, donde la proteína es altamente soluble [23]. Por tanto, la solubilidad de la proteína se ha reportado como el factor más importante en la determinar la funcionalidad del CS [23].

Por su parte, Jahaniaval F et al. [23] citan varios estudios donde se reporta una correlación directa entre la hidrofobicidad y las propiedades funcionales de proteínas, propiedades como la capacidad emulsificante y de formación de espuma.

El CS ha mostrado ser notablemente estable al calentamiento a pH=6.5 [23]. Sin embargo, el efecto del calentamiento de soluciones de CS (5-6% w/v, pH=7) a 132 °C por 60 min provocó una reducción en la viscosidad, en la hidrofobicidad relativa, en la capacidad de formación de espuma y en la emulsificante, en contraste la solubilidad y la estabilidad de la espuma se incrementan con este tratamiento de calentamiento [24].

Películas de CS

El CS puede fácilmente formar películas a partir de soluciones acuosas debido a su estructura azarosa y por su habilidad para formar enlaces de hidrógeno intermoleculares e interacciones hidrofóbicas, lo que resulta en un incremento de la cohesión entre cadenas [25].

Las películas de CS son atractivas para su uso en productos alimenticios debido a su transparencia, flexibilidad y naturaleza suave [25]. Sin embargo, para su preparación es necesaria la adición de agentes plastificantes para reducir la fragilidad, incrementar la dureza, la fuerza y la resistencia al impacto [16].

Generalmente las películas elaboradas a base de proteínas y polisacáridos forman películas con buenas propiedades mecánicas aunque presentan una pobre barrera a la humedad, debido a su hidrofobicidad [26]. Las películas de CS no son la excepción puesto que son altamente afines al agua lo que reduce drásticamente sus aplicaciones potenciales en medios acuosos.

Las películas a base de caseinatos son altamente solubles a pH 6-8 y completamente insolubles a pH 3 y 4 [27]. De hecho, los valores de permeabilidad al vapor de agua de las películas de CS son ligeramente más grandes que las correspondientes a las películas elaboradas a base de gluten, de proteína de soya y de zeína [3].

Cabe recordar que las caseinas son proteínas y en el caso de las películas comestibles éstas aportan también valor nutricional al producto (Cuadro 2). Su composición en aminoácidos es próxima a la considerada como ideal, y contienen además un cierto porcentaje de fósforo. Sin embargo, el CS está prácticamente desprovisto de calcio, ya que aunque este elemento se encuentra asociado a la caseína presente en la leche, se pierde durante la primera etapa de su transformación. De lo anterior, la caseína es un producto totalmente inocuo para la salud.

Cuadro 2. Propiedades físicas y composición de CS [2].

Peso molecular	10^7 - 10^9
Contenido de proteína	96 g/100 g materia seca
Punto isoelectrico	4.6
Composición de aminoácidos (g/100 g proteína)	
Ácido aspártico	7.13
Ácido glutámico	22.04
Cisteína	0.36
Lisina	8.12
Arginina	3.75
Histidina	2.92

1.3.6 Mezcla de biopolímeros: QTS y CS

En la industria láctea el QTS en solución ha sido empleado para remover la grasa de la leche, las proteínas y péptidos del suero de leche. Ausar et al. [28] reportaron que la adición de QTS a leche entera o descremada produce la desestabilización y coagulación de las micelas de caseína.

La formación de complejos se atribuye a la existencia de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre ambos biopolímeros, ya que la caseína se describe como una proteína que contiene dominios electronegativos hidrofílicos y dominios neutros hidrofóbicos. Por su parte, el QTS muestra dominios cargados positivamente hidrofílicos (aprox. 80% de glucosamina) y dominios neutros hidrofóbicos (20% N-acetil glucosamina) [28].

La importancia de las cargas negativas de los carboxilatos y fosfatos de la caseína en las interacciones electrostáticas con el QTS es evidenciado por el hecho de que el QTS es incapaz de precipitar a la caseína cuando esta soluble a pH 2.3, por de bajo de su punto isoelectrico, una condición en la cual la mayoría de los grupos estas protonados [28].

1.3.7 Entrecruzamiento químico

Con el objetivo de mejorar la calidad de los biomateriales se ha empleado el entrecruzamiento ya sea por métodos físicos (tratamientos térmicos, fotooxidación e irradiación con UV) o por métodos químicos (glutaraldehído, 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carboimidato (EDAC) o glioxal) que permiten modificar las propiedades mecánicas y biológicas de las macromoléculas [29].

Un agente entrecruzante tiene grupos reactivos en los dos extremos de la cadena que permiten ligar dos componentes moleculares a través de enlaces covalentes. Cuando la macromolécula posee varios grupos funcionales a lo largo de su estructura, por medio de estos agentes se pueden formar geles [8].

La eficiencia del entrecruzamiento depende de la especificidad hacia grupos funcionales particulares, la especificidad puede ser influenciada por las condiciones experimentales, principalmente el pH. Por su parte, la falta de especificidad puede ser importante en la modificación de macromoléculas que poseen más de un tipo de grupos funcionales como es el caso de las proteínas [8].

Afortunadamente, la presencia de grupos funcionales en un polímero pueden ser modificados a través de varias reacciones químicas que permiten incrementar la cantidad de grupos nuevos y específicos que favorecen la reacción de entrecruzamiento [8].

Los agentes homobifuncionales son agentes entrecruzantes que contienen dos grupos funcionales idénticos que reaccionan con el mismo grupo funcional presente en el polímero. Probablemente uno de los agentes homobifuncionales más extensamente empleados como agente entrecruzante es el glutaraldehído (GTA), el cual forma enlaces resistentes a los pH y temperaturas extremas. La estabilidad de los enlaces con GTA es más grande que las bases de Schiff [8]. Las bases de Schiff son iminas que contienen un grupo hidrocarboxílico en el átomo de nitrógeno $R_2-C=NR'$ con $R' \neq H$.

En la elaboración de películas comestibles el GTA, glioxal (GLY) y formaldehído (FA) han sido ampliamente utilizados para el entrecruzamiento de proteína de soya, colágeno, proteína de algodón, zeína y suero de leche. Provocando el mejoramiento de las propiedades mecánicas y propiedades de barrera de las películas [6].

El GTA tiene un uso muy frecuente en la ingeniería de tejidos debido a su solubilidad en agua y alta eficiencia de entrecruzamiento así como por su bajo costo [29].

En las proteínas el GTA puede enlazar los grupos amino entre dos cadenas adyacentes, puede reaccionar con la lisina, cistina, histidina y tirosina [6].

En la Figura 5 se muestra la estructura química del GTA.

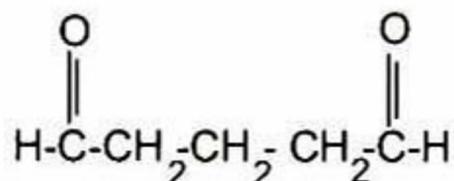


Figura 6. Estructura química del glutaraldehído (GTA)

Oyrton et al. [30] reportaron que el QTS se entrecruza con el GTA por medio de los grupos aminos pendientes del QTS que interactúan con el grupo aldehído del GTA para formar enlaces imina, donde existe este grupo se establece una resonancia con el doble enlace etilénico del GTA.

Del entrecruzamiento de CS con GTA se han obtenido microesferas para liberación de fármacos que son resistentes a la acción proteolítica del tracto digestivo durante más de 24 hrs [31].

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

El caseinato de sodio es capaz de interaccionar químicamente con el quitosan. Se espera que la interacción entre estos dos biopolímeros permita fabricar un biomaterial con adecuadas propiedades mecánicas y funcionales.

2.2. Objetivo general

Estudiar las interacciones químicas entre el quitosan y el caseinato de sodio y fabricar películas a partir de estos compuestos.

2.3 Objetivos específicos

- Estudiar el tipo de interacciones químicas, entre el quitosan y el caseinato de sodio mediante el uso de varias técnicas de caracterización.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas de las películas de quitosan-caseinato de sodio.
- Estudiar el tipo de interacciones químicas, entre el quitosan, caseinato de sodio y glutaraldehído mediante el uso de varias técnicas de caracterización.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas de las películas quitosan-caseinato de sodio-glutaraldehído.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales

- Caseinato de sodio (Sigma C-8654)
- Quitosan. Peso molecular: Medio DA: 75-85% (Sigma)
- Glutaraldehído (Sigma C-5882)
- Glicerol (Sigma C-7893)

3.2 Preparación de soluciones filmogénicas

Se preparó una solución de QTS 1.5% (w/v) en ácido acético al 1% mediante agitación magnética. La solución se ajustó a pH 6 con NaOH 1N y se agitó vigorosamente durante 32 h hasta obtener una solución homogénea, la cual finalmente se filtró. La solución de CS se prepara al 1.5% (w/v) en NaOH 0.20 N y se ajustó a pH 8 con HCL 1N

Mediante agitación constante se mezclaron ambas soluciones en una proporción de 1:1. La mezcla se realizó gota a gota, incorporándose la solución de CS a la solución de QTS. El agente plastificante, glicerol (GLI), se incorporó a la solución filmogénica de QTS-CS en una concentración de 10% (w/w) sólidos.

En la preparación de las películas QTS-CS-GTA, se adicionó el glutaraldehído (GTA) a la mezcla de QTS-CS en dos niveles de concentración: 0.25 y 0.50% (w/w) para finalmente agitar vigorosamente la mezcla.

3.3 Fabricación de películas

La solución filmogénica se vertió en cajas petri de plástico de 10 cm de diámetro, el disolvente se eliminó por evaporación, para lo cual se colocaron las cajas petri en la estufa a 40 °C. De esta forma se obtuvo una película que se puede separar fácilmente del soporte.

Las diferentes formulaciones para la preparación de las películas, se resume en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Formulaciones para la preparación de películas.

QTS pH=6	CS pH=8	GLI	GTA
1.5 (w/v)	1.5 (w/v)	0%	0%
1.5 (w/v)	1.5 (w/v)	10% (w/w)	0%
1.5 (w/v)	1.5 (w/v)	0%	0.25% (w/w)
1.5 (w/v)	1.5 (w/v)	0%	0.50% (w/w)
1.5 (w/v)	1.5 (w/v)	10% (w/w)	0.25% (w/w)
1.5 (w/v)	1.5 (w/v)	10% (w/w)	0.50% (w/w)

3.4 Caracterización de películas

Se emplearon diversas técnicas de caracterización de materiales para determinar las interacciones moleculares entre ambos biopolímeros así como las propiedades fisicoquímicas de las películas preparadas a partir de la mezcla de éstos compuestos.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Se recubrieron con oro las películas y se realizaron observaciones con 500 y 5000 aumentos en un microscopio electrónico de barrido ambiental con microsonda de análisis químico elemental (Philips XL30 ESEM).

Resonancia Magnética Nuclear (RMN). El espectro RMN en estado sólido se obtuvo con el método de desacoplamiento de protones y con el espectrómetro Varian Unity Plus 300 el cual operó a una frecuencia de 75.47 MHz para el carbono 13. Los desplazamientos químicos fueron referenciados con los picos del estándar secundario adamantino a 29.5 ppm (con respecto a TMS).

Espectroscopia de infrarrojo (IR). Las películas se analizaron con un equipo Perkin Elmer Modelo Spectrum One con una resolución de 4 cm^{-1} y con 60 barridos por cada espectro.

Difracción de R-X (XRD). Los difractogramas se obtuvieron de un difractómetro de rayos-X (XRD, RIGAKU DMAX/2100) con radiación Cu-K α , con un voltaje de 30 kV y una corriente de 16 mA. Las corridas se realizaron en un intervalo 2θ desde 5 hasta 40°

Análisis termogravimétrica (TGA). El análisis fue realizado en un equipo TGA/SDTA Mettler Toledo, 851e con crisoles de aluminio de tapa perforada y con aproximadamente 7 mg aprox. de muestra. Las pruebas se realizaron en una atmósfera de aire desde $30\text{ }^\circ\text{C}$ hasta $500\text{ }^\circ\text{C}$ con una rampa de calentamiento de $5\text{ }^\circ\text{C}$ cada minuto.

DSC modulado. Las propiedades térmicas de las películas se evaluaron en un calorímetro diferencial de barrido (DSC) Q100 de TA Instruments. La temperatura inicial de la corrida de calentamiento fue de $-70\text{ }^\circ\text{C}$, el calentamiento se realizó con una tasa de $3\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta una temperatura final de $200\text{ }^\circ\text{C}$. La modulación fue de $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ y con período de 60 segundos.

Pruebas mecánicas. Las pruebas mecánicas de las películas fueron determinadas con una máquina universal Texture Analyser (TA-XT2i Stable Micro Systems, UK).

Fuerza a la punción. Las películas fueron cortadas en círculos de 4.1 cm de diámetro las cuales fueron acondicionadas a 75 %HR durante 24h antes de realizar las pruebas mecánicas. Posteriormente las películas fueron colocadas en el orificio superior de frascos de permeabilidad. Se aplicó una carga perpendicular a la película mediante una sonda de 2mm de diámetro a una velocidad 2 mm/s hasta la ruptura de la película.

La fuerza a la punción se calculó como la fuerza máxima al rompimiento (N) por unidad de espesor de la película (mm). Se determinó el espesor en tres posiciones a lo largo de la película usando un micrómetro manual (Käfer, Germany). Un total de cuatro muestras de cada tipo de película fue evaluado.

Fuerza a la tensión. Se siguió el procedimiento estandarizado ASTM D 882-88 (ASTM, 1989) [32]. Las películas fueron cortadas en forma de probeta de 16.5 cm de largo, 2 cm de ancho en los extremos de la tira y 0.6 mm de ancho en centro de la tira. Antes de realizar las pruebas las películas fueron acondicionadas a 75 %HR durante 24h. La fuerza a la tensión (MPa) fue calculada dividiendo la fuerza máxima a la ruptura (N) por el área de la sección transversal de la película ($w \cdot d$), donde w es el ancho de la película en el punto de rompimiento (m) y d es el espesor de la película (m). Se determinó el espesor en cinco posiciones al azar a lo largo de la película usando un micrómetro manual (Käfer, Germany), el promedio de los espesores fue empleado para estimar el área de la sección transversal. Un total de cuatro muestras de cada tipo de película fue evaluado.

Porcentaje de elongación (%E). Se siguió el procedimiento estandarizado ASTM D 882-88 (ASTM, 1989) [32]. Se empleó una probeta con las mismas dimensiones que la prueba anterior. El porcentaje de elongación al rompimiento fue calculado dividiendo la deformación a la ruptura por la longitud inicial de las muestras y multiplicando por 100%. Un total de cuatro muestras de cada tipo de película fue evaluado.

Permeabilidad al vapor de agua (PVA). La transferencia de vapor de agua a través de las películas se determinó utilizando el método gravimétrico ASTM E96-80 [33]. La película fue montada en una celda de permeabilidad que fue llenada con 18 mL de agua destilada, la celda tiene un área de exposición de 13.20 cm², la cual fue sellada herméticamente con empaques de teflón. Las celdas de permeabilidad fueron colocadas en un desecador al vacío con sílica gel y se monitoreo la pérdida de peso para determinar el transporte de vapor de agua.

Se determinó el espesor en cinco posiciones al azar a lo largo de la película usando un micrómetro manual (MITUTOYO), empleándose el promedio de los espesores para los cálculos.

La permeabilidad al vapor de agua se calculó con la siguiente fórmula:

$$PVA = \frac{\Delta W \cdot x}{\Delta t \cdot A \cdot \Delta p} \quad \text{Ec. 1}$$

donde:

ΔW : pérdida de peso de la celda de permeabilidad (mol)

Δt : tiempo transcurrido durante el análisis (s)

A : superficie expuesta de la película (m²)

x : espesor de la película (m)

Δp : diferencia de presión en el vapor de agua (Pa)

3.5 Análisis estadístico

Para la caracterización de las propiedades físicas de las películas, fuerza a la punción, fuerza a la tensión, espesor películas y permeabilidad al vapor de agua, se evaluaron cuatro replicas. Diferencias entre medias fueron analizadas empleando la prueba de Tukey con un nivel de significación de $p < 0.05$. El análisis estadístico fue realizado utilizando el paquete estadístico STATISTICA 4.3.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

En el presente trabajo las películas de QTS fueron flexibles, translúcidas y con una ligera coloración amarilla. Sin embargo, varios autores señalan que las películas de QTS en estado seco son rígidas y quebradizas [5], [1], transparentes y claras aunque con cierta coloración amarilla [34], [35].

En cambio, las películas de CS fueron quebradizas, transparentes y sin coloración. Usualmente en la fabricación de películas flexibles y blandas se adiciona un agente plastificante.

Por otro lado, las películas de QTS-CS fueron flexibles, no translúcidas y con tonalidad blanca. El resto de las películas a base de QTS-CS-GTA fueron también flexibles, no translúcidas y con una mayor tonalidad amarilla, esto se explica por la adición del agente entrecruzante (GTA). La misma coloración amarilla fue observada en películas de glutenina entrecruzadas con GTA [6].

4.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

En la Figura 7 se muestran las micrografías de las diferentes películas preparadas en el presente trabajo. Las superficies de las películas fueron heterogéneas debido a que la matriz polimérica estuvo conformada por partículas de forma irregular.

En la matriz polimérica del QTS (Figura 7a) se observaron pequeños gránulos de aproximadamente 2 μm de tamaño. Por su parte, en el CS se detectaron lotes aislados de forma irregular de tamaño mayor a 10 μm .

La interacción química entre el QTS y CS (Figura 7c) dio origen a la formación de gránulos de 5-10 μm de tamaño, gránulos que presentaron cierto grado de porosidad lo que explica la alta retención de agua así como un mayor transporte de moléculas de agua a través de las cavidades lo que provoca altos valores de permeabilidad al vapor de agua (PVA).

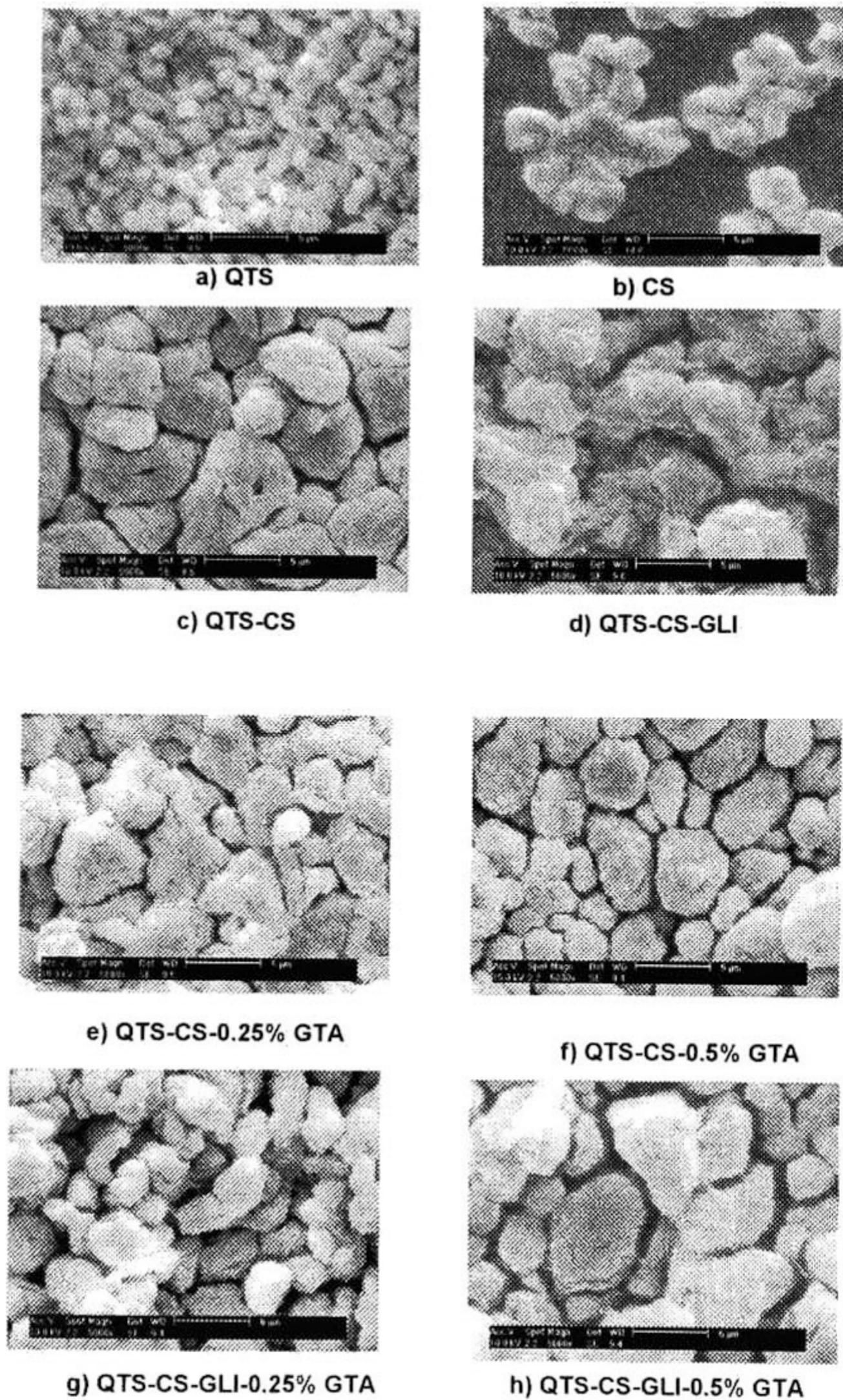


Figura 7. Micrografías de películas (5000X).

4.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Debido a la naturaleza semi-cristalina del QTS, se detectaron señales angostas y bien definidas en el espectro ^{13}C RMN del QTS, en cambio para el CS las señales fueron anchas y de poca resolución (Figura 8). A pesar de esta limitación se logró identificar en el espectro del CS algunos grupos funcionales característicos de una proteína (Cuadro 4)

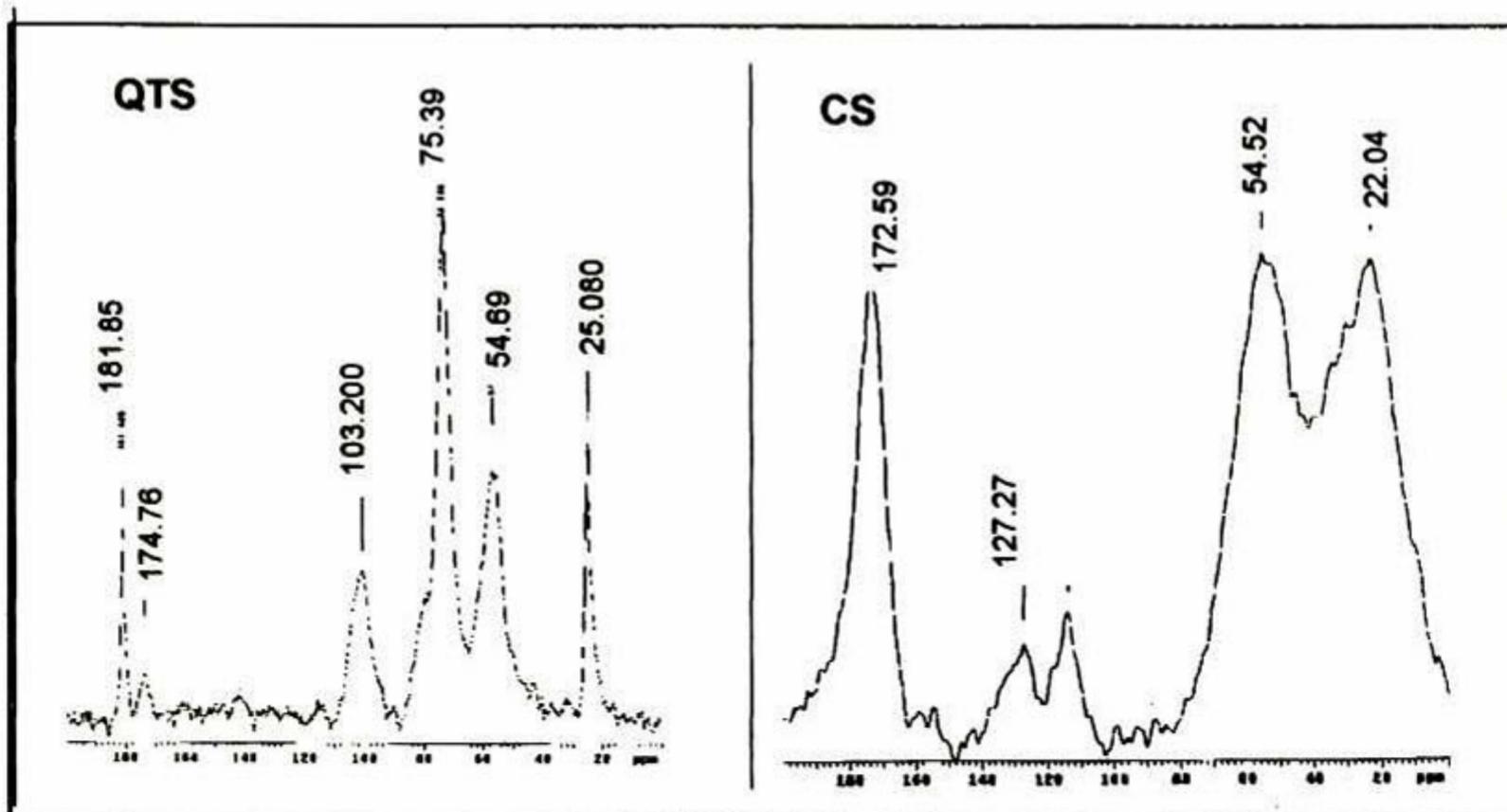


Figura 8. Espectro ^{13}C -RMN de QTS y CS.

Cuadro 4. ^{13}C desplazamiento químicos (δ) del CS (ppm desde TSM).

GRUPO FUNCIONAL	δ (ppm)
-C=O	172.5
Aromático (Fenilalanina, triptofano, etc.)	112.2
C- α	54.5
Cadena alifática de aminoácidos residuales	22.0

Los desplazamientos químicos (δ) del CS, indicados en el Cuadro 4, son muy semejantes a los reportados por ter Beek, L.C. et al. [36] quienes encontraron señales de grupos carbonilos, carboxilos, aromáticos y de alfa carbonos en los espectros ^{13}C RMN de la beta caseína, donde solamente una pequeña fracción de los carbonos presentes en la beta caseína (30-40 aminoácidos residuales) contribuyeron en la detección de dicho espectro. En el presente trabajo no se determinaron los aminoácidos que dieron origen al espectro ^{13}C RMN.

Las señales observadas en el espectro ^{13}C RMN del QTS se atribuyeron a cada carbono de la unidad estructural (2-amino-2-deoxi-D-glucopiranososa) (Figura 9). Estas señales, denominadas desplazamientos químicos (δ), se muestran en el Cuadro 5.

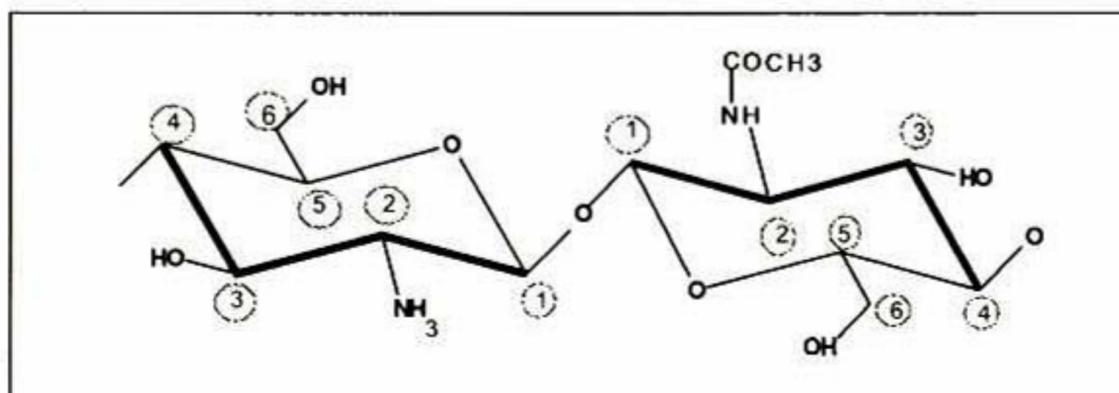


Figura 9. Estructura química del QTS.

Cuadro 5. Desplazamientos químicos (δ) ^{13}C del QTS.

SIMBOLO	δ (ppm) ^a	δ (ppm) ^b	δ (ppm) QTS FORMA SALINA ^b	δ (ppm) PRESENTE ESTUDIO
-C=O	176.5	NR	175 aprox.	174.1
C-1	108.1	105.0	100.1	101.3
C-4	84.7	86.5,81.2	83.7	81.0
C-5/C-3	78.7	75.5	74.6/71.0	74.9
C-2/C-6	60.9	60.3/56.4	55.4	57.6/57.50
-CH ₃	26.8	NR	26 aprox.	25.8

NR No reportada

^a Vishu et al. [37]

^b Saitô et al. [14]

Todos los espectros ^{13}C RMN de las películas elaboradas a base de QTS (Figura 10), exhibieron señales de grupo un carbonilo ($\delta=180$ ppm) y de un metilo ($\delta =24$ ppm), señales que fueron atribuidas a la solución acuosa de ácido acético empleado para disolver el QTS. Es importante comentar que cuando el QTS es disuelto en ácidos orgánicos se encuentra en su forma salina y bajo estas condiciones la molécula sufre cambios estructurales drásticos, lo que produce un ensanchamiento en las señales de sus espectros de RMN [14].

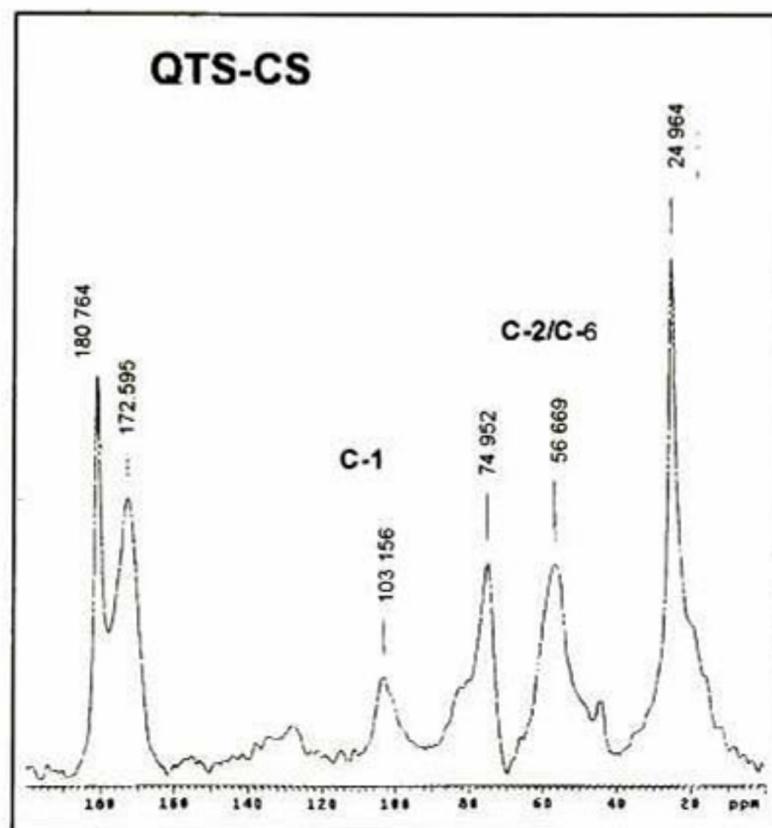


Figura 10. Espectro ^{13}C -RMN de película QTS-CS.

Como evidencia del grado de la no completa desacetilación del QTS utilizado (DA=87% aprox.), se detectaron desplazamientos químicos en 176.5 ppm y 25.805 ppm, señales que denotaron la presencia de grupos acetilos ($-\text{COCH}_3$) aún remanentes en la molécula de QTS (Figura 8).

A pesar del “desorden” estructural del CS, los espectros ^{13}C RMN de las películas mostraron un patrón muy similar al espectro del QTS puro donde fue posible identificar la interacción química entre el QTS y el CS (Figura 10 y Figura 11).

Analizando con detalle los espectros de las diferentes películas preparadas se observó constante la señal correspondiente al grupo metilo, esto es debido a que este grupo funcional es poco reactivo. Únicamente se detectaron pequeñas variaciones en los desplazamientos químicos de dicho grupo desde 24.769 hasta 25.805 ppm.

Las mezclas de QTS-CS y QTS-CS-GTA provocaron cambios en la posición del C-1, cambios que se relacionan con modificaciones conformacionales en los enlaces glucosídicos de las unidades estructurales del QTS, esto se explica por la relación que existe entre los cambios de los desplazamientos químicos del C-1 del QTS con el ángulo de torsión del enlace glucosídico [37], [14].

Los desplazamientos químicos correspondientes a los C-2, C=O y C-3/C-6 experimentaron cambios de posición. Es muy probable que el C-2 de la unidad estructural del QTS haya interactuado químicamente con una molécula donadora de electrones, considerando que el C-2 tiene pendiente un grupo amino protonado muy reactivo que fácilmente acepta electrones. Los cambios observados en los grupos carboxilos del CS y del QTS así como los C-3/C-6, que tienen grupos hidroxilos pendientes, pueden ser atribuidos a la formación de puentes de hidrógeno.

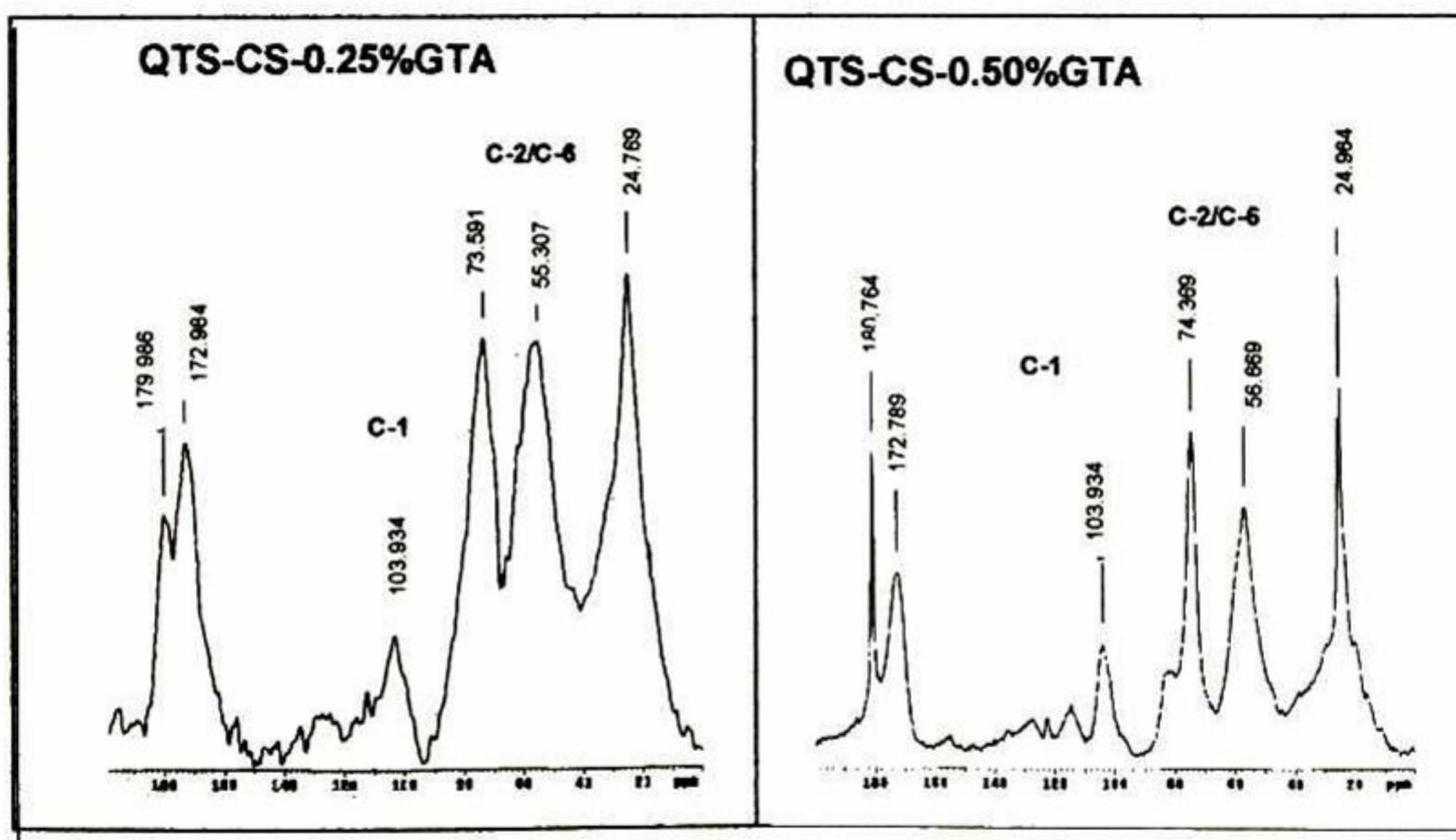


Figura 11. Espectro ¹³C-RMN de QTS-CS-GTA.

A manera de resumen y con el objetivo de esquematizar las variaciones de los desplazamientos químicos de los carbonos C-1, C-2, C-3/C-6 y C=O se muestra la Figura 12.

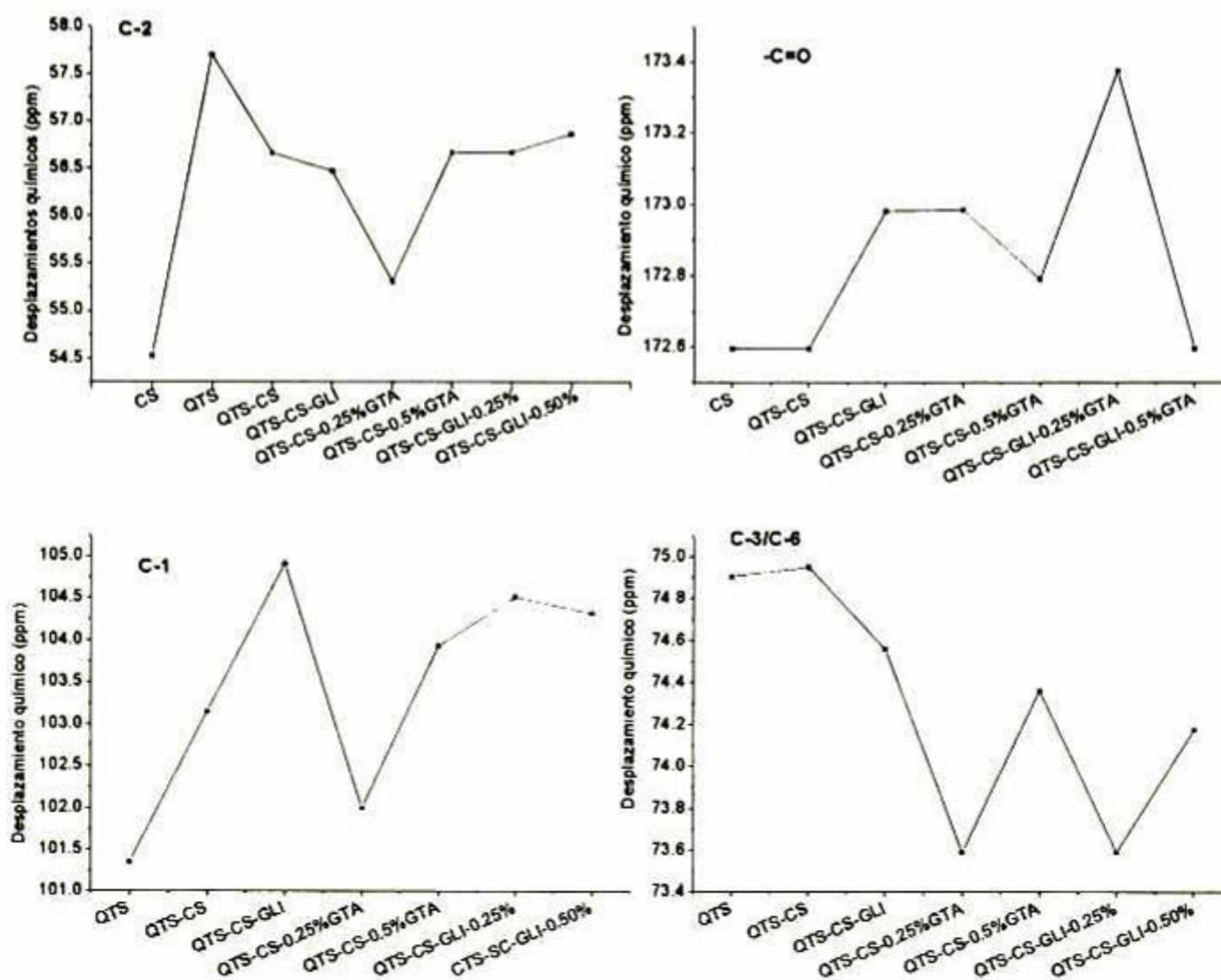


Figura 12. Variaciones de los desplazamientos químicos de los carbonos C-1, C-2, C-3/C-6 y C=O.

4.3 Espectroscopia de infrarrojo (IR)

En el espectro del QTS en hojuela (Figura 13) se detectó la ausencia de grupos -OH libres los cuales se caracterizan por una banda espectral fina y bien resuelta en los alrededores de $3600-3000\text{ cm}^{-1}$. Por el contrario, se encontró una banda espectral ancha que fue resultado de los puentes de hidrógeno intra- e intermoleculares en los grupos hidroxilos del C-3 y C-6 del QTS [37].

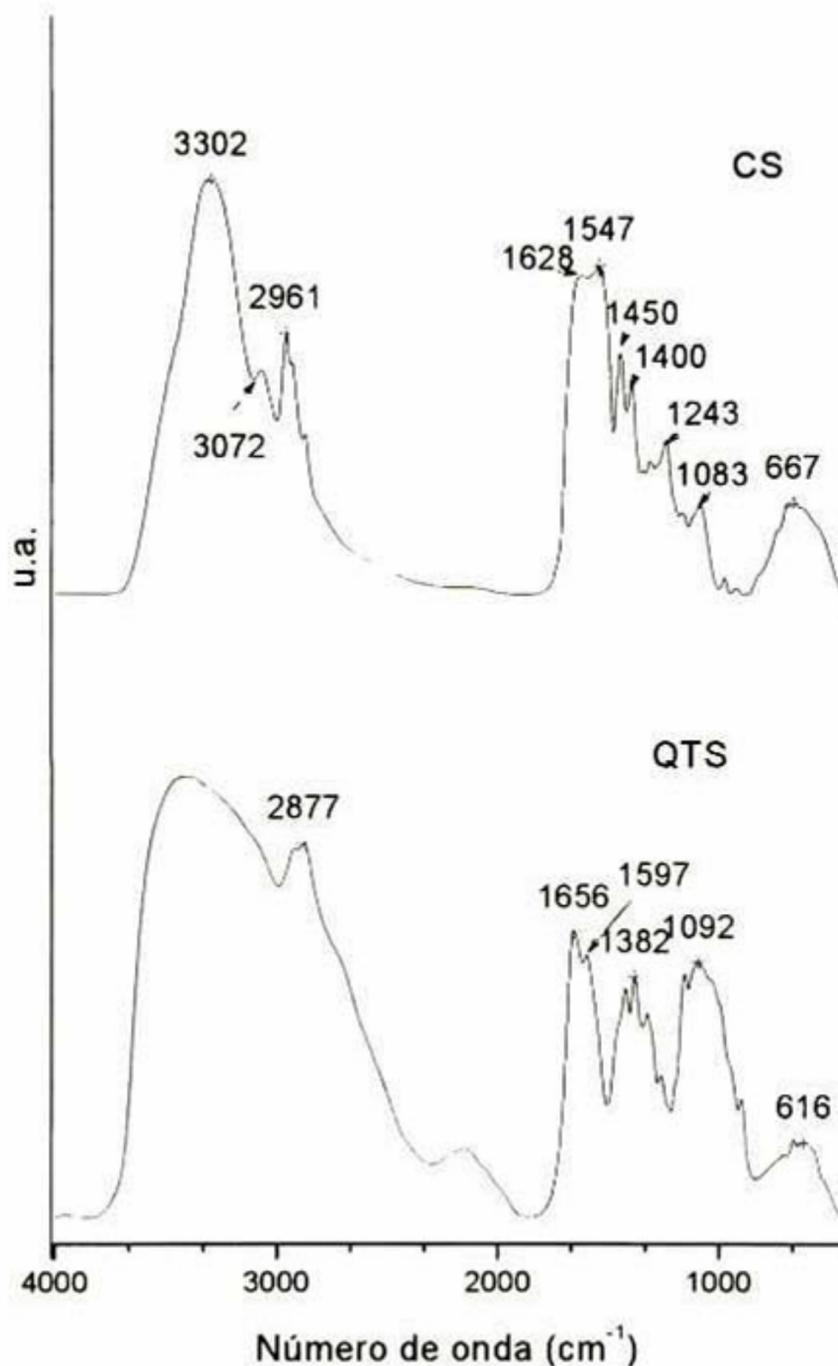


FIGURA 13. Espectro infrarrojo en las películas de CS y de QTS.

Las bandas de absorción características del QTS así como su identificación se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Identificación de grupos funcionales de espectros IR de películas a base de QTS.

BANDA DE REFERENCIA (cm ⁻¹) ^a	BANDA EXPERIMENTAL (cm ⁻¹)	TIPO DE VIBRACIÓN
3371	3400	v O-H v N-H
2918/2881	2924/2877	v _{as} CH ₂ v _s CH ₂
1650	1656	δ C=O amida (Banda amida I)
1594	1597	v N-H (Banda amida II)
1419-1320	1421-1320	δ O-H v _s C-H v C-N
1153/1074/900	1155-1035	v -C-O-C- (Enlace glucosídico)
473	616	δ -C-C-

v Vibraciones de estiramiento

δ Vibraciones de flexión

^a Vishu Kumar A.B., Gowda L.R. y Tharanathan R. N. [37]

Del espectro de CS se logró identificar los grupos funcionales relevantes que dieron origen a dicho espectro (Figura 13 y Cuadro 7). Estas bandas de absorción fueron muy semejantes a las observadas por Barreto et al. [16] en películas de CS plastificadas con sorbitol.

Cuadro 7. Identificación de grupos funcionales de espectros IR de películas de CS.

BANDA DE REFERENCIA (cm ⁻¹) ^a	BANDA EXPERIMENTAL (cm ⁻¹)	TIPO DE VIBRACIÓN
3300	3303/3072	v O-H v N-H
	2961	v CH ₃
1655	1628	v C=O amida (Banda amida I)
1550	1547	δ N-H (Banda amida II) /v C(≡O) ₂
1450	1450	δ _s CH ₃
	1400	v _s C(≡O) ₂ v C-N
	1243	δ O-H
1100	1083	δ -C-H- (Fuera del plano de grupos aromáticos)
	665	δ NH ₂ (Fuera del plano)

^a Barreto P.L.M., Pires A.T.N. y Soldi V. [16].

v Vibraciones de estiramiento

δ Vibraciones de flexión

A causa del empalmamiento entre las señales de absorción del QTS y CS, la espectroscopia de infrarrojo, por sí sola, no puede ser utilizada para obtener una prueba definitiva del tipo de enlaces o interacciones químicas entre ambos componentes. Sin embargo, el análisis de IR provee cierta evidencia de la interacción química entre ambos biopolímeros (Figura 14)

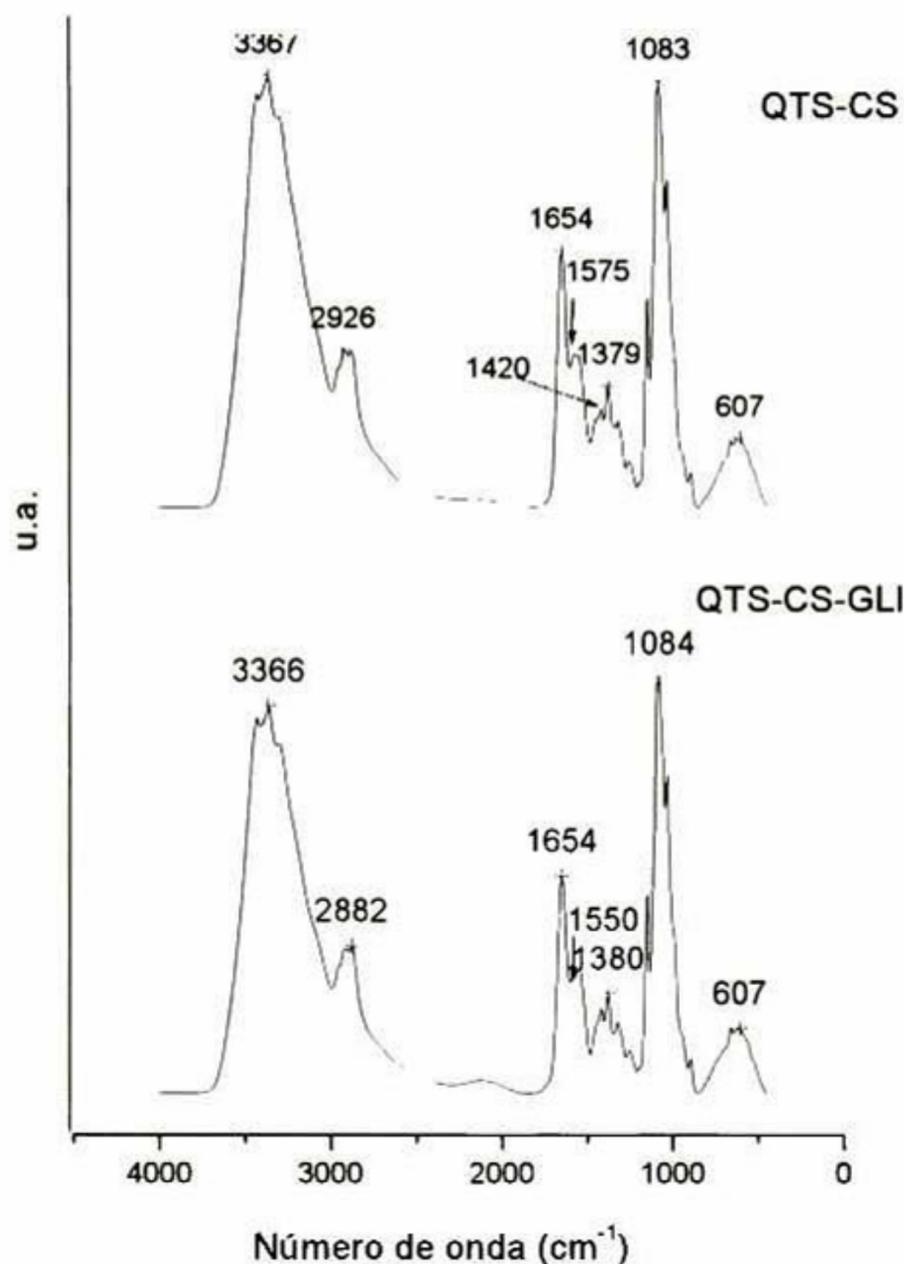


Figura 14. Espectro infrarrojo en películas QTS-CS y QTS-CS con glicerol (GLI).

En la comparación del espectro IR de la película de QTS-CS con los espectros de sus componentes individuales, la banda de absorción correspondiente a las vibraciones de estiramiento (ν) de los grupos -O-H y N-H cambió hacia bajos números de onda (3367 cm^{-1}), debido a la formación de puentes de hidrogeno intra- e intermoleculares entre ambos biopolímeros. La disminución en el número de onda en los puentes de hidrógeno es ocasionada por la alteración de la constante de fuerza de ambos grupos funcionales, por tanto las frecuencias de ambas vibraciones de estiramiento y flexión son modificadas. Las bandas de estiramiento se mueven hacia bajas frecuencias (altas longitudes de onda) usualmente con un incremento en la intensidad y ensanchamiento de banda [38].

Una evidencia de la formación de puentes de salinos, fue la intensa banda angosta y perfilada de la banda amida I y el desplazamiento hacia bajos números de onda de la banda amida II (desde 1594cm^{-1} hasta 1575cm^{-1}) de la película QTS-CS (Figura 15). Las disminuciones de los número de onda de las bandas amida I y amida II también se han observado en diferentes mezclas como: QTS-Gelatina [1], [39], QTS-Colágeno [40], QTS-Konjac glucomanan [5].

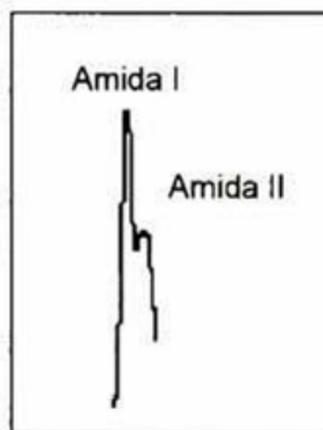


Figura 15. Banda amida I y amida II de película QTS-CS.

Cabe mencionar que la intensa banda observada en el intervalo de $900\text{-}1200\text{cm}^{-1}$ demostró la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos -OH del QTS y del CS.

Con base en estas evidencias y a los resultados de RMN, se puede inferir que la mezcla de QTS-CS involucró la formación de puentes salinos y puentes de hidrógeno intermoleculares entre los grupos abundantes de -O-H y -NH_3^+ y los escasos grupos -C=O aún remanentes del QTS con los grupos -O-H , -NH_3^+ y -COO^- del CS. Sin embargo, no fue posible determinar con exactitud que parejas de grupos interaccionaron primordialmente.

Los espectros de las películas elaboradas con QTS-CS-GTA se presentan en la Figura 16.

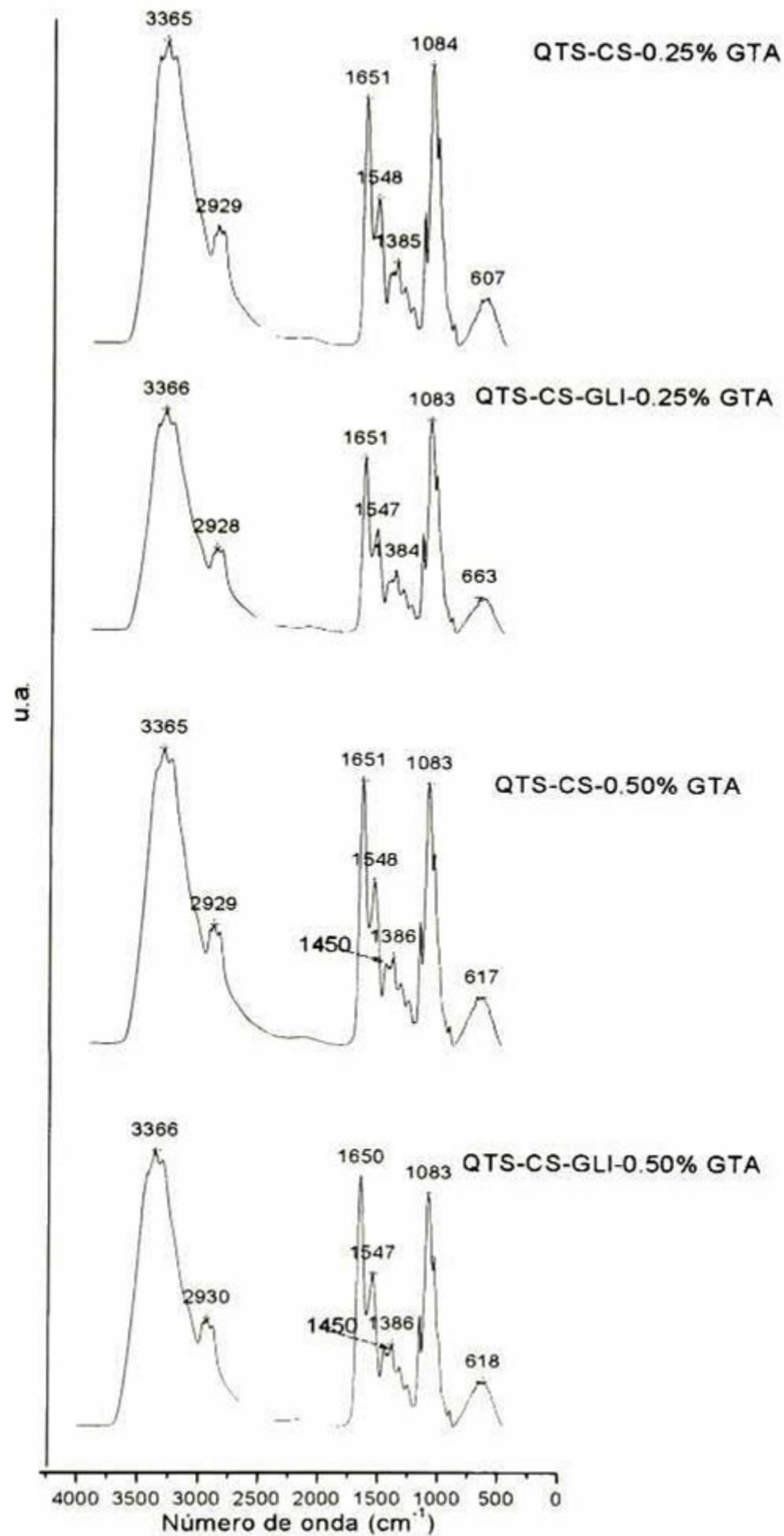


Figura 16. Espectro infrarrojo en películas QTS-CS-GTA y QTS-CS-GLI-GTA.

La incorporación de GLI a la mezcla filmogénica de QTS-CS y QTS-CS-GTA no provocó modificaciones significativas en los espectros IR, únicamente aumentó la intensidad de las señales (Figura 14 y Figura 16). En cambio, la adición de 0.25% (w/w) y 0.50% (w/w) GTA aumentó la intensidad y refinó la señal de las bandas amida I y amida II (Figura 16).

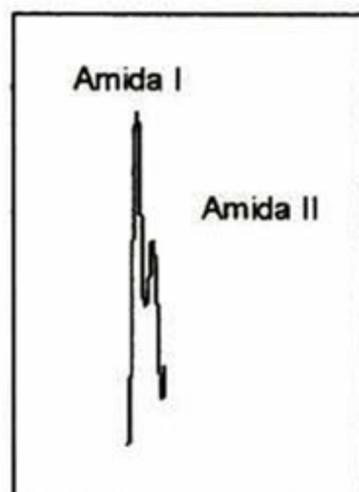


Figura 17. Banda amida I y amida II de película QTS-CS-GTA.

La posición de la banda amida I se consideró prácticamente constante en las cercanías de 1648 cm^{-1} , no observándose este mismo comportamiento en la banda amida II, la cual cambió de posición hacia bajos números de onda (desde 1575 hasta 1546 cm^{-1}).

Debido a la similitud entre los grupos funcionales del QTS y CS es complicado identificar con exactitud las interacciones moleculares entre el QTS, CS y GTA, aunque es muy probable la reacción de los grupos aldehídos terminales del GTA con un grupo amino protonado del QTS o del CS (Figura 18).

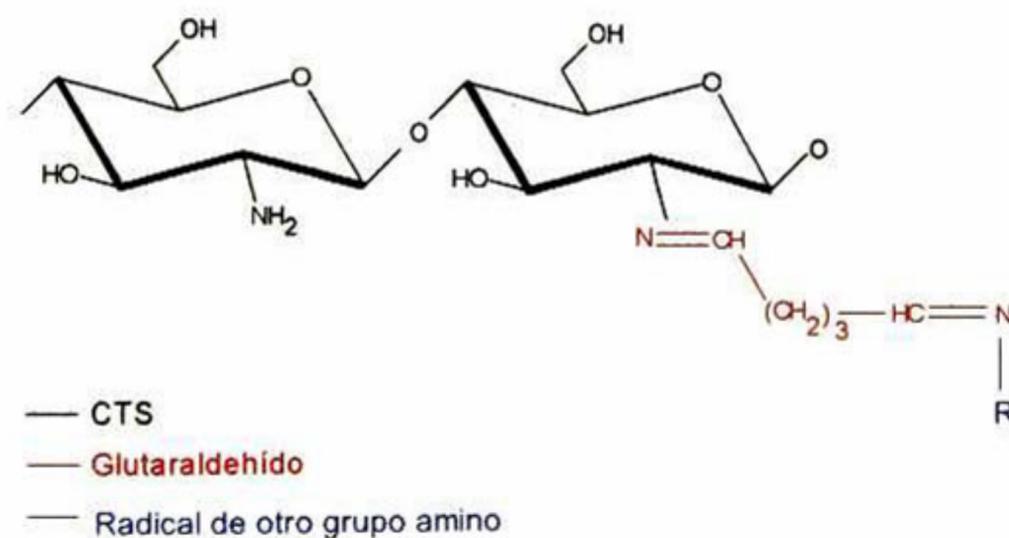


Figura 18. Reacción entre QTS, CS y GTA.

Es importante comentar que para la película QTS-CS-GTA la banda de estiramiento asignada al grupo $-\text{CH}_2$, la cual depende de la conformación del alcohol primario del QTS (C-6), se desplazó desde 1420 hasta 1450 cm^{-1} . Esto probablemente indica un cambio del microambiente del alcohol primario y por lo tanto un cambio de todos los enlaces de hidrógeno de la red polimérica. Un fenómeno muy similar fue observado en moléculas de QTS de bajo peso molecular (LMWC) por Vishu Kumar et al. [37].

Apoiados en los resultados de RMN, se confirmaron las modificaciones localizadas en la banda amida II (C-2) y en el alcohol primario del C-6 del QTS, donde la adición de 0.50% (w/w) de GTA manifestó los cambios más significativos.

4.4 Difracción de rayos X (XRD)

Generalmente el QTS presenta dos poliformas cristalinas. La primera, la más abundante se le conoce como "tendon" QTS, que es una forma hidratada de la molécula. La segunda, se identifica como QTS "recocido", la cual se prepara por el calentamiento del "tendon" QTS en presencia de agua a altas temperaturas, alrededor de 200 °C, que es la forma deshidratada. La transición de "tendon" a "recocido" nunca es total y generalmente se observa una mezcla de ambas poliformas [41].

Por lo anterior, el QTS presenta dos picos cristalinos en los alrededores $2\theta=9-11^\circ$ (forma hidratada) y $2\theta=18-20^\circ$ (forma anhidra) [42], [1], [5]. En el presente estudio para el QTS en hojuela, estas dos señales se observaron en $2\theta=10.28^\circ$ y 19.92° (Figura 19).

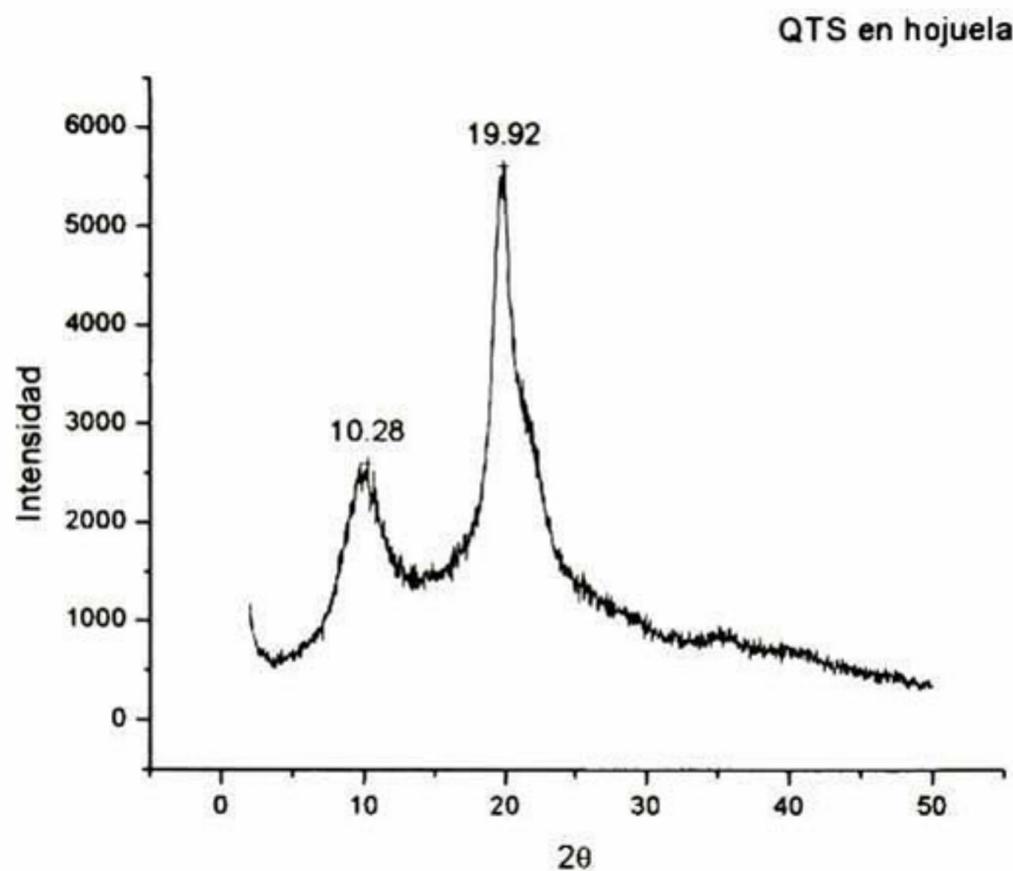


Figura 19. Difractograma R-X de QTS en hojuela.

Zong et al. [43] observaron que el QTS en hojuela presenta una reflexión de mayor intensidad en $2\theta=20^\circ$, mientras que para una película de QTS preparada a partir de una solución agua/ácido acético se observó una reflexión débil a los $2\theta=20^\circ$ y una reflexión fuerte a los $2\theta=10^\circ$. Estas observaciones fueron explicadas por el cambio parcial de la forma cristalina anhidra ($2\theta=20^\circ$) con una conformación compacta hacia una forma más extendida de la forma cristalina hidratada ($2\theta=10^\circ$). Pa y Yu. [44] reportaron que un incremento en la concentración de la solución acuosa de ácido acético aumenta la cantidad de grupos $-NH_3$ en la molécula de QTS que permite a su vez incrementar la repulsión electrostática intramolecular y por tanto una expansión de la molécula de QTS.

Sin embargo, autores como Kam et al. [34] y Fernández-Cervera et al. [35] encontraron que las películas de QTS son amorfas cuando el QTS es disuelto en una solución acuosa de ácido acético.

El difractograma de las películas de QTS preparadas en el presente trabajo exhibieron un conjunto de señales nuevas, donde las señales de mayor intensidad fueron $2\theta=11.44$, 19 , 22.52 y 29.8° (Figura 20), estas señales parecen corresponder a la sal acetato de sodio hidratado. Es muy probable que durante el proceso de ajuste de pH del QTS con NaOH 1N, los iones acetato hayan interactuado químicamente con los iones de sodio para formar el acetato de sodio.

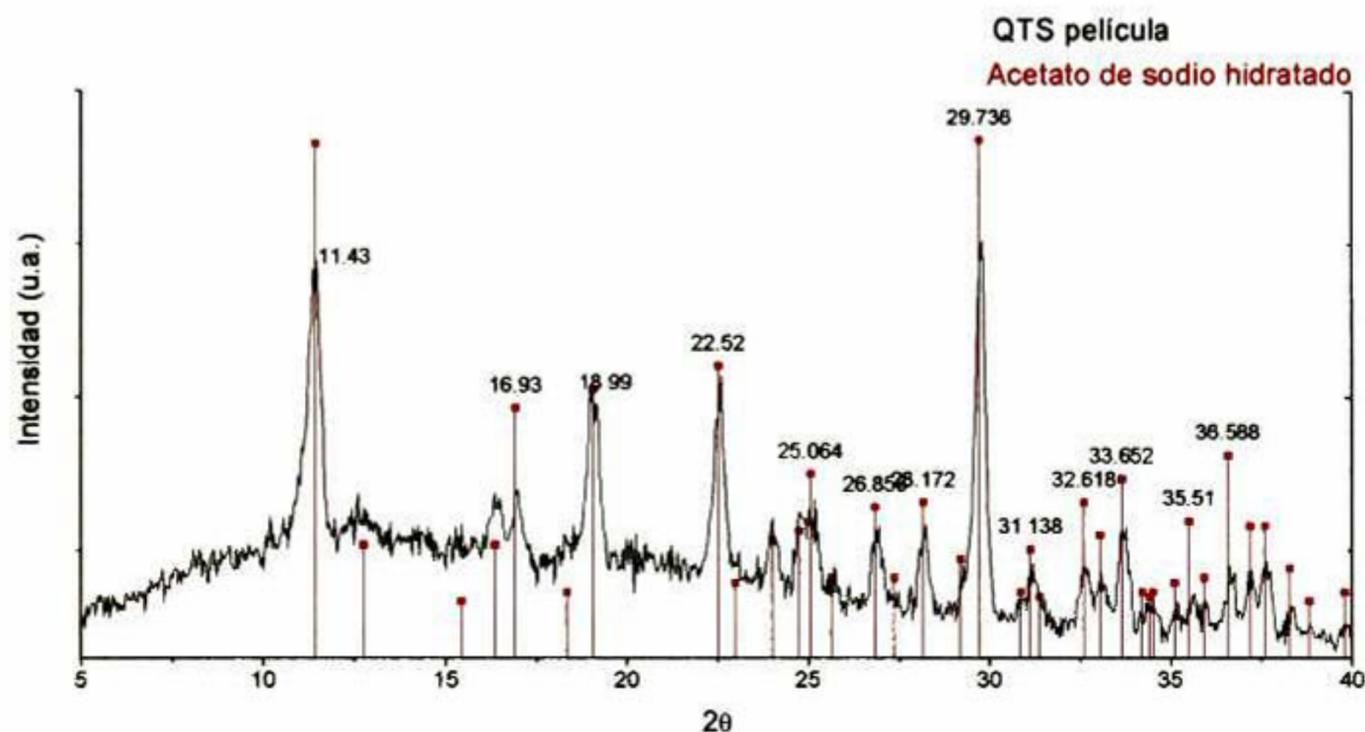


Figura 20. Difractograma R-X de película a base de QTS.

Con el propósito de eliminar el acetato de sodio presente en las películas de QTS, se lavaron todas las películas con agua destilada. Finalmente, se observó que el QTS conservó su carácter semi-cristalino con un pico muy intenso en 10.48° y una región amorfa en los alrededores de 14.36° (Figura 21).

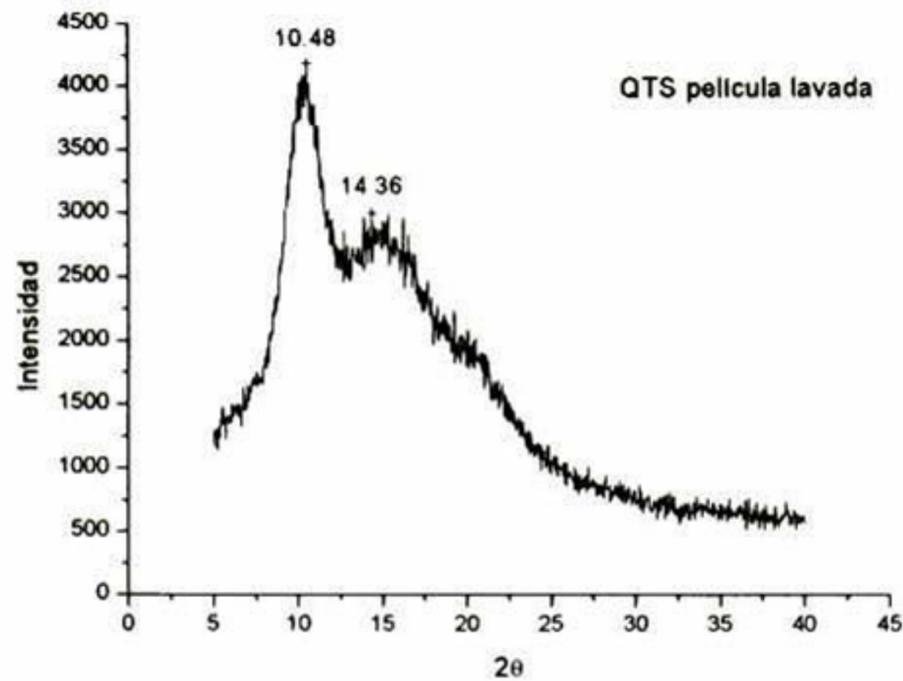


Figura 21. Difractograma R-X de película de QTS lavada.

Por su parte, el CS en polvo no exhibió algún pico cristalino distinguible, únicamente se detectaron dos bandas anchas en $2\theta=9.63$ y 20.2° . Las películas de CS fueron amorfas y sólo se detectaron dos banda anchas traslapadas en $2\theta=9.45$ y 17.88° aproximadamente (Figura 22).

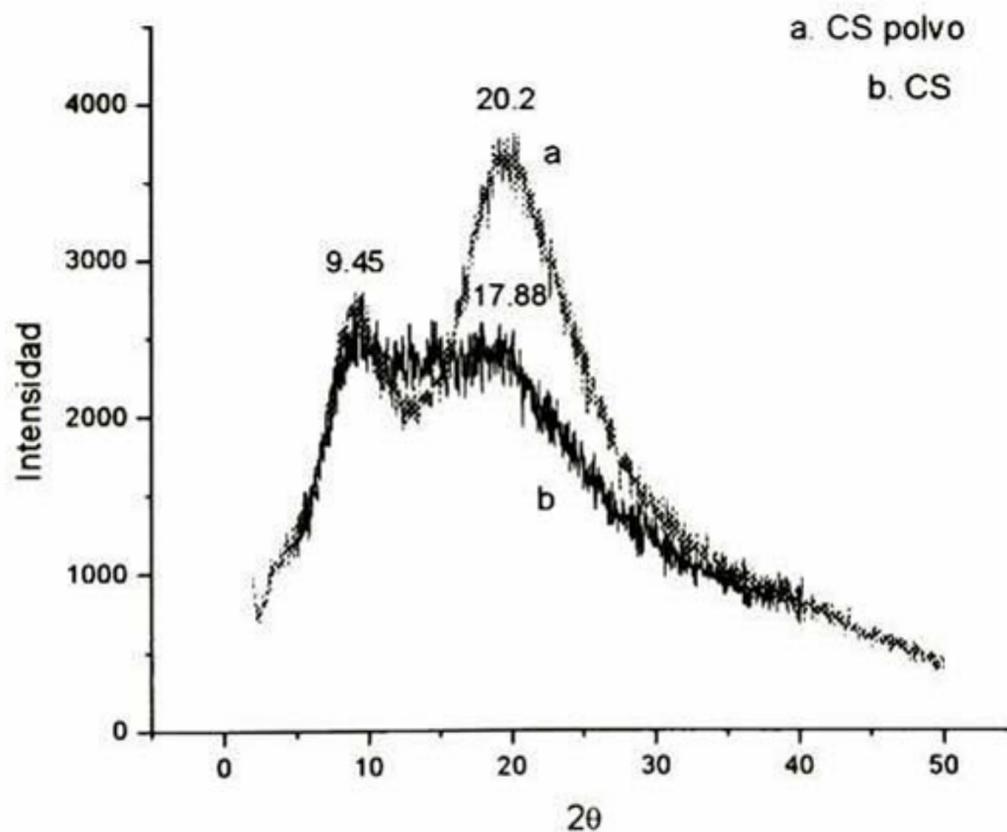


Figura 22. Difractograma R-X de CS polvo y CS película.

El difractograma de las películas de QTS-CS mostró dos bandas anchas amorfas que se relacionaron con el complejo QTS-CS (Figura 23), que parecen coincidir con las señales del QTS aunque con carácter totalmente amorfo.

Si el QTS y el CS hubieran presentado baja compatibilidad, en el difractograma de la mezcla, se hubiesen observado las regiones cristalinas propias de cada componente [1]. Opuestamente, los picos de difracción de la mezcla de ambos biopolímeros son de menor intensidad, disminuyendo el grado de cristalinidad debido a la interacción QTS-CS que impide la cristalización de QTS.

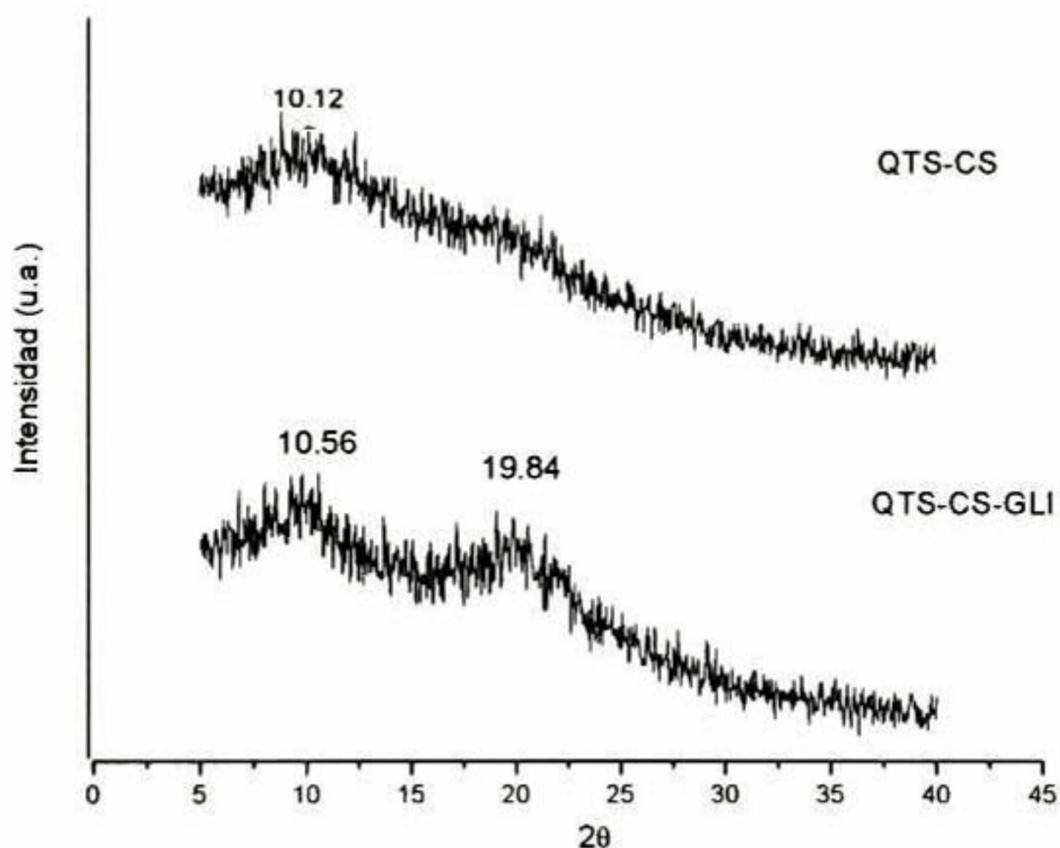


Figura 23. Difractograma R-X de películas QTS-CS y QTS-CS-GLI.

Los difractogramas de las películas de QTS-CS-GTA presentaron un comportamiento semejante al de las películas QTS-CS, con dos regiones amorfas en $\sim 10^\circ$ y $\sim 20^\circ$ (Figura 24).

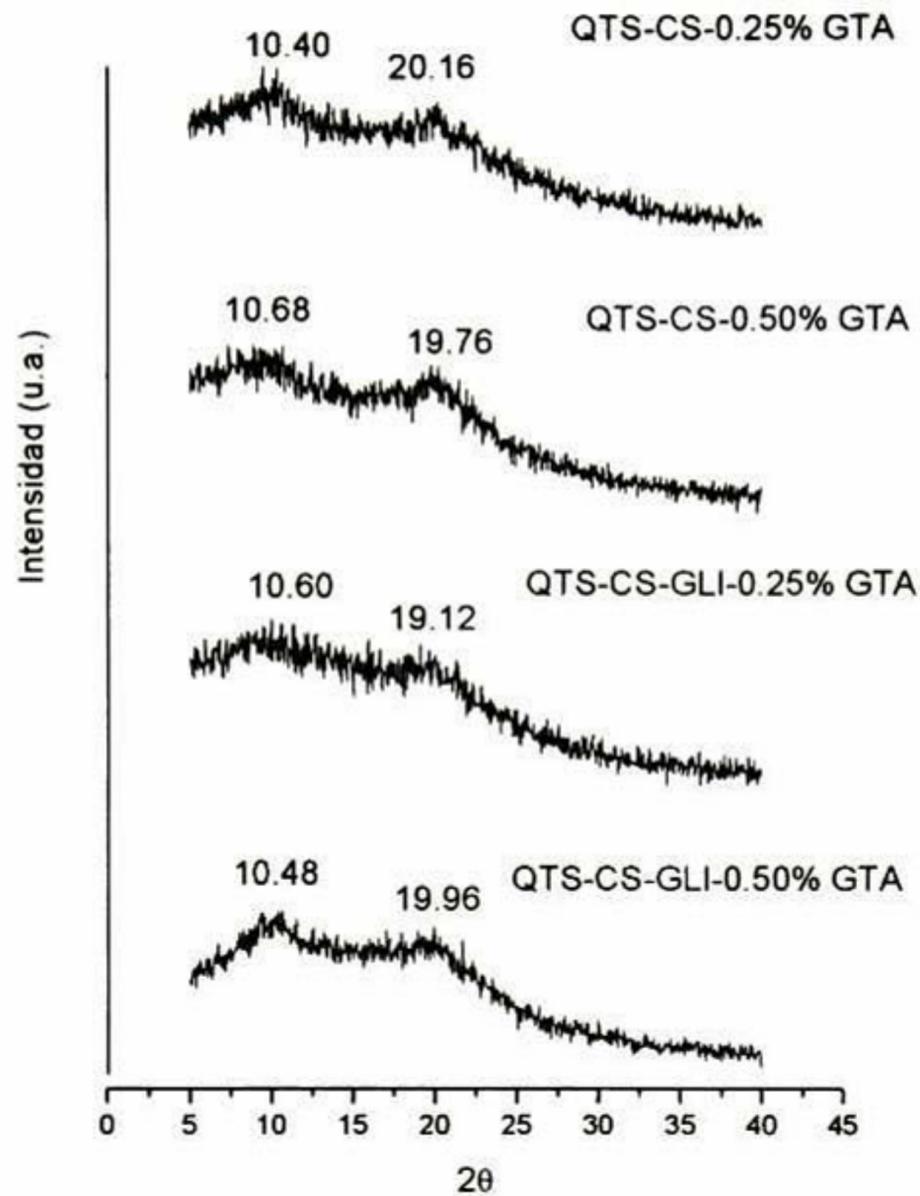


Figura 24. Difractograma R-X de películas QTS-CS-GTA y QTS-CS-GLI-GTA.

Al parecer la adición de GLI no provocó modificaciones considerables en el nivel de cristalinidad. Cabe comentar que el GLI no tiene mayor efecto que disminuir el número de interacciones entre las cadenas poliméricas.

4.5 Análisis termogravimétrico (TGA)

Las diferentes películas evaluadas mostraron un patrón termogravimétrico (TG) muy semejante entre sí que se caracterizó por dos pérdidas de peso consecutivas. La primera, involucró la deshidratación de las películas, en cambio la segunda comprendió la descomposición térmica del material (Figura 25).

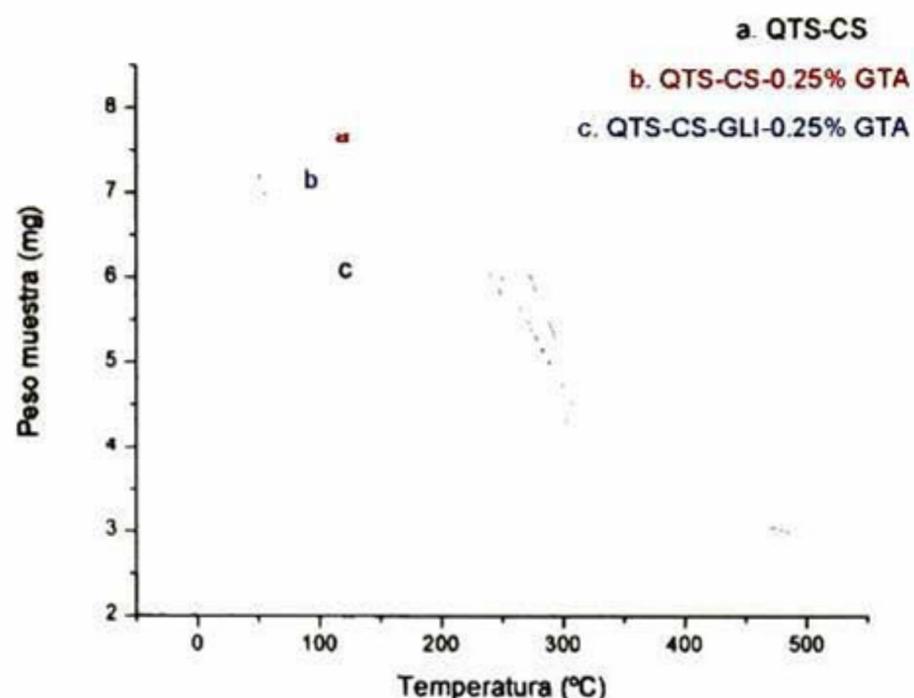


Figura 25. Termograma de película QTS-CS, QTS-CS-0.25%GTA y QTS-CS-GLI-0.25%GTA.

En el Cuadro 8 se especifican los intervalos de temperatura así como las pérdidas de peso correspondientes a cada etapa.

Cuadro 8. Características termogravimetricas (TG) de películas.

MATERIAL	TG (°C)*		
QTS	33.34-158 (-11.59%)	158.46-378.58 (-31.11%)	380.48-499.32 (-10.71%)
CS	36.44-48.03 (-0.119%)	47.85-193.79 (-5.18%)	194.26-461.3 (-38.39)
QTS-CS	31.87-159.35 (-13.53%)	158.87-497.77 (-46.41%)	
QTS-CS-GLI	70.26-157.74 (-3.92%)	158.21-497.28 (-53.3%)	
QTS-CS-0.25% GTA	33.69-165.89 (-7.73%)	165.89-495.71 (-48.29%)	
QTS-CS-0.50% GTA	32.6-166.86 (-11.62%)	167.33-497.78 (-47.28%)	
QTS-CS-GLI-0.25% GTA	32.17-152.48 (-5.32%)	152.01-497.66 (-53.91%)	
QTS-CS-GLI-0.50% GTA	32.41-150.26 (-9.27%)	149.79-498.32 (-51.15%)	

*Todos los datos en paréntesis se refieren a la pérdida de peso en el intervalo de temperatura dado.

En los diagramas DTG (termogramas diferenciales) se observaron las dos pérdidas de peso anteriormente mencionadas, la primera se caracterizó por un pico angosto y poco pronunciado que fue ocasionado por el desprendimiento de moléculas de agua adsorbida y ligada, así como de residuos de disolventes; donde la mayor pérdida de peso se observó en la película QTS-CS (13.53%). La segunda pérdida se caracterizó por un pico perfilado que evidenció la desintegración de las interacciones intra- e intermoleculares y del rompimiento parcial de la estructura molecular (Figura 26) [5].

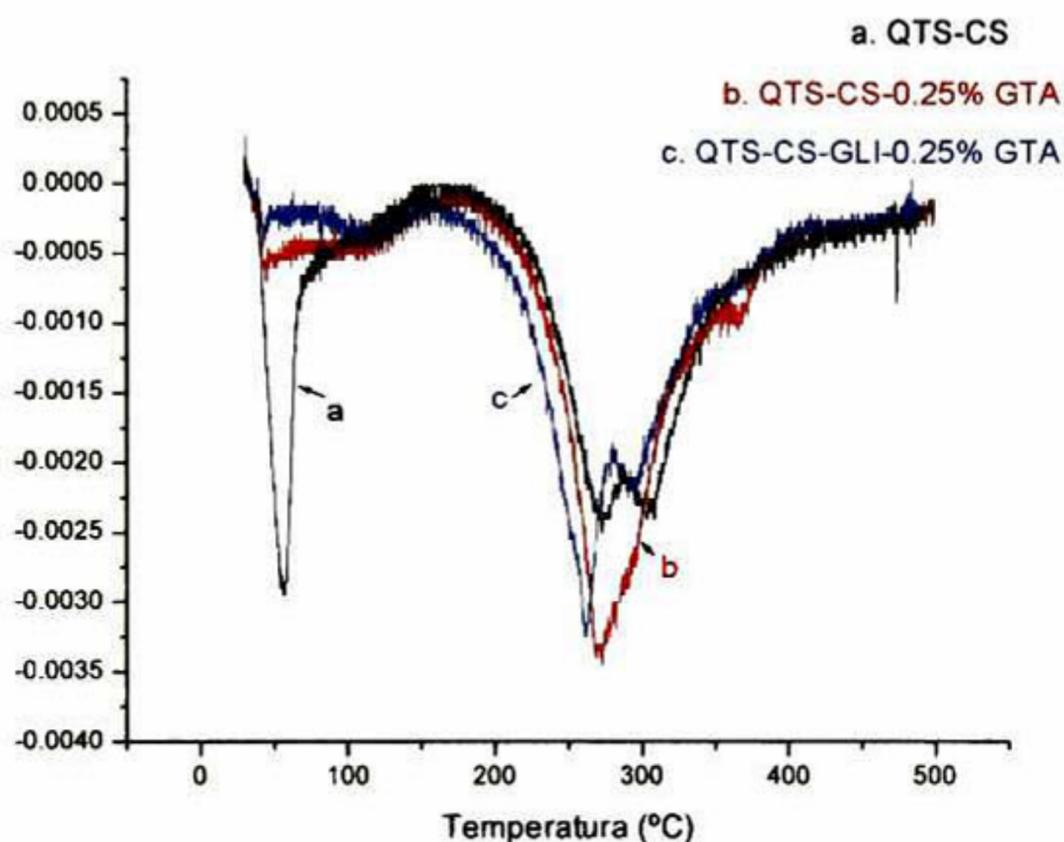


Figura 26. Termogramas diferenciales de películas.

De los diagramas DTG, las temperaturas de descomposición del QTS y CS fueron en 256.14 °C y 283.28 °C, respectivamente. Estos valores concuerdan con lo reportado en la literatura, para el QTS, varios autores señalaron que la temperatura de descomposición se encuentra entre 250-300 °C [35], [44], [50]. Para películas de CS, Barreto et al. [21] indican que la temperatura inicial de descomposición se inicia en 300 °C y la temperatura máxima de descomposición se sitúa 333 °C.

En las películas de QTS-CS, QTS-CS-GLI y QTS-CS-GTA se observaron dos picos en los diagramas DTG, el primer pico indica la temperatura de descomposición de los complejos formados, localizándose en el intervalo de 260.26 °C a 278.71 °C (Cuadro 9). La segunda señal o temperatura de descomposición se observó a 290-300 °C. Para la película de QTS-CS es muy probable que esta segunda señal se deba al QTS y CS residuales, para el resto de las películas esta señal parece ser ocasionada por la presencia de GLI.

En cambio, las películas QTS-CS-0.25% GTA y QTS-CS-0.50% GTA mostraron exclusivamente una temperatura de descomposición (273.21 y 278.71 °C, respectivamente).

Cuadro 9. Temperaturas de los diagramas DTG.

MATERIAL	DTG (°C)*				
QTS	45.58 [*]	N.D.	256.14 ^{**}	371.78 [*]	480.87 [*]
CS	48.22 [*]	165.79 [*]	283.28 ^{**}	N.D.	493.98 ^{**}
QTS-CS	55.69 ^{**}	N.D.	273.17 ^{**}	302.64 ^{**}	N.D.
QTS-CS-GLI	N.D.	118.02 [*]	261.44 ^{**}	294.3 ^{***}	N.D.
QTS-CS-0.25% GTA	45.02 [*]	112.38 [*]	273.12 ^{**}	291.27 ^{***}	359.31 [*]
QTS-CS-0.50% GTA	44.06 [*]	76.60 [*]	278.71 ^{**}	N.D.	346.36 [*]
QTS-CS-GLI-0.25% GTA	45.08 [*]	112.53 [*]	260.69 ^{**}	290.55 ^{***}	353.74 [*]
QTS-CS-GLI-0.50% GTA	45.10 [*]	86.90 [*]	260.26 ^{**}	295.23 ^{***}	347.56 [*]

*Pico ancho de baja intensidad

** Pico intenso

*** Hombro

N.D. No detectado

La temperatura de descomposición disminuyó en presencia de GLI, lo que indicó un decremento en la estabilidad térmica (Barreto et al. [21]). A causa de la inestabilidad térmica del sistema, las películas adicionadas con GLI reportaron las pérdidas de peso más altas desde 51 hasta 53%.

Las películas preparadas a partir de la mezcla de QTS-CS no fueron significativamente más estables que las de las películas de QTS y CS. El carácter amorfo de los complejos, es decir, su estructura desordenada, soporta éste punto de vista. Una situación semejante de inestabilidad fue encontrada en complejos de Almidón de maíz fosfatado-Caseína [45] y en complejos de Almidón de papa-Caseína [46].

4.6 DSC modulado

La transición vítrea concierne los movimientos moleculares de la región amorfa de un polímero por tanto es un fenómeno que en principio debe ocurrir en todos los materiales no cristalinos o semi-cristalinos. La transición vítrea es muy sensible a los cambios en las interacciones moleculares; por tanto las mediciones de la transición vítrea pueden ser usadas para determinar y caracterizar diferencias estructurales entre muestras o cambios en una misma muestra [47].

Las temperaturas de transición vítrea (T_g) son usualmente medidas por un calorímetro diferencial de barrido (DSC). El DSC modulado que es una técnica en la cual el programa convencional de calentamiento es modulado por alguna forma de perturbación, por lo cual ésta ofrece varias ventajas en la búsqueda de transición vítrea puesto que separa los procesos reversibles, tal como la transición vítrea de los procesos no-reversibles tal como las endotermas de relajación o reacción de curado, lo que hace más fácil identificar la T_g en sistemas complejos donde hay varias transiciones. Otro beneficio que ofrece el DSC modulado es una muy alta resolución puesto que se pueden emplear tasas de calentamiento muy bajas [48].

Es valioso comentar que la transición vítrea no es un punto termodinámico fijo, este depende de las tasas de calentamiento y enfriamiento, del historial térmico y mecánico del material, así cómo del método utilizado para determinarlo [47].

En la determinación de la Tg de las películas de QTS y CS así como de sus mezclas se realizaron dos corridas de calentamiento con el objetivo de eliminar el historial térmico pues en la primera corrida se observaron relajaciones endotérmicas que dificultaron la determinación de la Tg. Finalmente, los valores de Tg mostrados en el Cuadro 10 fueron obtenidos de la segunda corrida de calentamiento.

Cuadro 10. Temperatura de transición vítrea (Tg).

MATERIAL	ΔC_p (J·g ⁻¹ ·K ⁻¹)	T inicial (°C)	T media (°C)	T final (°C)
QTS	0.295	144.09	145.63	159.31
CS	0.186	178.47	178.22	181.15
QTS-CS	0.266	162.19	168.28	181.72
QTS-CS-GLI	0.404	137.35	142.88	153.28
QTS-CS-0.25%GTA	0.126	164.59	173.93	185.69
QTS-CS-0.50%GTA	0.369	171.42	179.37	190.03
QTS-CS-GLI-0.25%GTA	0.328	125.30	126.76	143.27
QTS-CS-GLI-0.50%GTA	0.449	122.00	131.66	142.23

Existe una confusión en la determinación de la Tg del QTS debido a la dificultad en la preparación de la muestra y a la alta higroscopicidad del material. De ahí que varios estudios se han enfocado a elucidar este valor. Autores como Sakurai et al. [49] estimaron que la Tg del QTS es de 203 °C. En cambio autores como Flores-Ramirez et al. [50] señalan la Tg del QTS en hojuela es de ~140 °C. Finalmente, Dong et al. [51] emplearon cuatro técnicas diferentes para identificar la Tg del QTS en película, ellos afirman que la Tg se encuentra en el intervalo de 140-150 °C.

A pesar de los trabajos realizados no se ha llegado a un acuerdo para estimar con exactitud la Tg del QTS, pues hay una serie de factores que se deben considerar en la determinación de este parámetro, como es la fuente del QTS empleado, el historial térmico del material así como la controversia por el traslape de expansiones provocadas por transiciones β con la Tg. En el presente trabajo se encontró una aparente Tg en las películas de QTS en 145.6 °C.

En la primera corrida de calentamiento de las películas de QTS se detectó un pico endotérmico a $\sim 50^{\circ}\text{C}$ que fue atribuido a la pérdida de agua y disolvente presente en el sistema.

Fernández-Cervera et al. [35] señalan que las películas de QTS tienen una alta afinidad por el agua en comparación con el QTS en hojuelas dado que probablemente en las películas las moléculas de QTS se encuentran protonadas, haciendo así más hidrofílicas las películas que el QTS en hojuela. La plastificación con GLI provocó bajos valores de T_g , inclusive valores menores a los encontrados en las películas de QTS. El GLI resultó un plastificante efectivo para impedir las interacciones inter- e intramoleculares, facilitando la movilidad molecular y disminuyendo la fricción interna en el biopolímero [21]. Las películas preparadas con QTS-CS-GTA mostraron una alta afinidad con el GLI que el complejo QTS-CS, siendo menor la T_g en la mezcla QTS-CS-GLI-GTA.

El entrecruzamiento con GTA incremento la T_g de las películas, donde la temperatura de transición vítrea (T_g) más alta se observó en la película de QTS-CS-0.50%GTA. En sistemas entrecruzados, la T_g depende del grado de entrecruzamiento y con un incremento del grado de entrecruzamiento, la temperatura de transición vítrea cambia hacia altos valores [48], [52]. Este incremento en la T_g se explica por el aumento de la rigidez de la cadena y de la intensidad de las interacciones inter- e intramoleculares, lo que impide la rotación interna a lo largo de la cadena macromolecular [21]. Con base en lo anterior se puede concluir que la película con mayor concentración de GTA presentó un mayor grado de entrecruzamiento.

4.7 Fuerza a la punción

La fuerza a la punción no ha sido usada ampliamente como ha sido la fuerza a la tensión para describir las propiedades mecánicas de películas. Sin embargo, la fuerza a la punción ofrece información útil puesto que se define como la resistencia al impacto con otro material, esto es, la resistencia del material a la deformación por tanto indica la durabilidad del material.

Esta propiedad mecánica comúnmente se expresa en newtons (N) aunque algunos autores que prefieren expresarlo como fuerza por unidad de espesor de la película (N/mm) o como fuerza por unidad área de la sección transversal (MPa). En el presente trabajo, la fuerza a la punción se expresa en N/mm para hacerla independiente del espesor, sin embargo en la comparación de resultados fue necesario emplear unidades de MPa (Cuadro 11).

Los valores de fuerza a la punción obtenidos de las películas preparadas se muestran en el Cuadro 11 y Figura 27.

Cuadro 11. Fuerza a la punción de películas.

MATERIAL	FUERZA A LA PUNCIÓN			
	(N/mm)		MPa	
	Media	Desv.	Media	Desv.
QTS	67.27 ^c	8.98	2.69 ^c	0.35
CS	106.40 ^{ab}	11.11	4.11 ^{ab}	0.43
QTS-CS	123.30 ^a	15.31	4.76 ^a	0.59
QTS-CS-GLI	42.68 ^{cd}	3.92	1.65 ^{cd}	0.15
QTS-CS-0.25%GTA	65.15 ^{cd}	4.82	2.53 ^{cd}	0.19
QTS-CS-0.50% GTA	93.68 ^b	14.22	3.62 ^b	0.55
QTS-CS-GLI-0.25% GTA	42.28 ^d	5.16	1.63 ^d	0.20
QTS-SC-GLI-0.50% GTA	43.98 ^{cd}	6.50	1.70 ^{cd}	0.25

Media de cuadro 4 mediciones.

** Valores con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

* Media de cuadro 4 mediciones.

** Valores con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

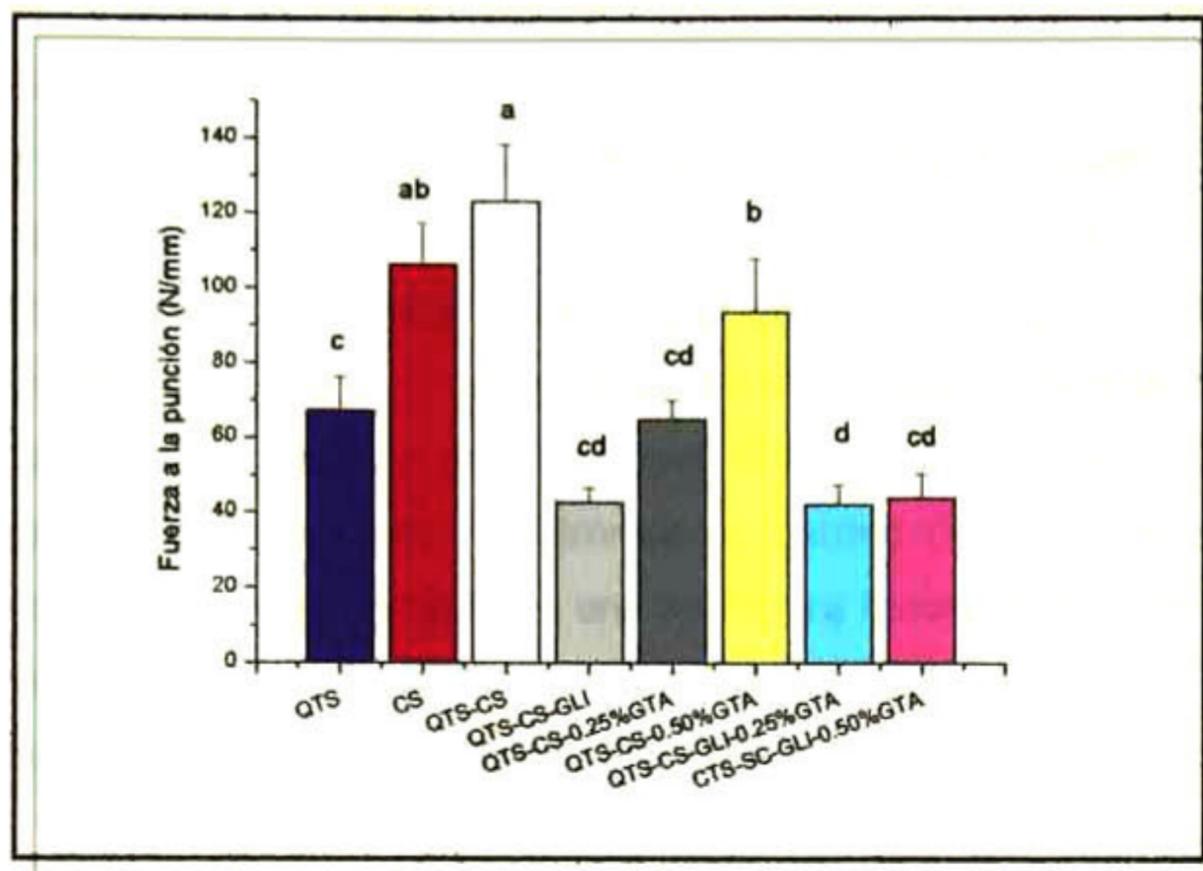


Figura 27. Fuerza a la punción de películas.*

*Valores con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

La fuerza a la punción de las películas de QTS (67.2 N/mm o 2.69 MPa) fue muy inferior a lo observado por Zivanovic et al. [53] (310.7 N/mm). Estas diferencias son atribuidas a varios parámetros como es la concentración de la solución filmogénica, la fuente de QTS, el peso molecular y de la naturaleza del disolvente empleado para la preparación de la solución [15].

Opuestamente al QTS, la fuerza a la punción de las películas CS (106.4 N/mm o 4.11 MPa) fue superior a lo reportado por Banerjee y Chen. [54] quienes señalaron para películas de CS una fuerza a la punción de 1.92 MPa.

Los puentes de hidrógeno intra- e intermoleculares entre el QTS y CS, observados en espectroscopia de infrarrojo, provocaron una fuerza a la punción alta en las películas de QTS-CS (123.3 N/mm o 4.76 MPa), valor que superó a

La adición de GLI provocó la disminución de la fuerza a la punción de las películas plastificadas (42.6 N/mm o 1.65 MPa), esto es, la función del GLI es debilitar la fuerza de las interacciones intermoleculares entre las cadenas adyacentes de la red polimérica.

La fuerza a la punción de las películas de QTS-CS-GTA presentó valores inferiores a los encontrados para el complejo QTS-CS, es muy probable que durante el acondicionamiento (75% H.R. por 24 hrs) éstas películas hallan captado una mayor cantidad de agua y debido a la acción plastificante del agua las propiedades mecánicas del material hayan sido reducidas. Con base en las microfotografías de microscopia electrónica de barrido (SEM), es importante comentar que las películas exhibieron una estructura heterogénea formada por gránulos porosos, lo que probablemente produjo que el agua quedara ocluida en la red polimérica de las películas de QTS-CS-GTA.

La adición de 0.50% GTA favoreció el proceso de entrecruzamiento de ambas moléculas, provocando un incremento en la fuerza a la punción de las películas aunque no mayor a la fuerza a la punción de la película de QTS-CS.

Los valores obtenidos de fuerza a la punción de las películas preparadas en el presente trabajo fueron comparados con los resultados reportados por otros investigadores (Cuadro 12).

Cuadro 12. Comparación de fuerza a la punción de películas elaboradas a base de biopolímeros.

MATERIAL	FUERZA A LA PUNCIÓN (MPa)
Cloruro de vinilideno (PVCD) ^a	33.198
Salvado de arroz ^a	7.0 -16.4
Proteína de soya ^b	2.3
Proteína de soya con plastificante ^b	0.48-0.72
Caseinato de sodio ^c	1.92
Caseinato de potasio ^c	2.03
Caseinato de calcio ^c	5.44
Suero de leche concentrado ^c	1.69
QTS-CS (presente estudio)	4.76
QTS-CS-0.50%(w/w) GTA (presente estudio)	3.62

^aGnanasambandam et al. [55]

^bCao y Chang, [56]

^cBanerjee y Chen, [54]

4.8 Fuerza a la tensión y porcentaje de elongación (%E)

Los valores de fuerza a la tensión y el porcentaje de elongación, esto es, la fuerza máxima que puede soportar una película ante un esfuerzo a la tensión y la capacidad de estiramiento de las películas, se muestran en la Figura 28.

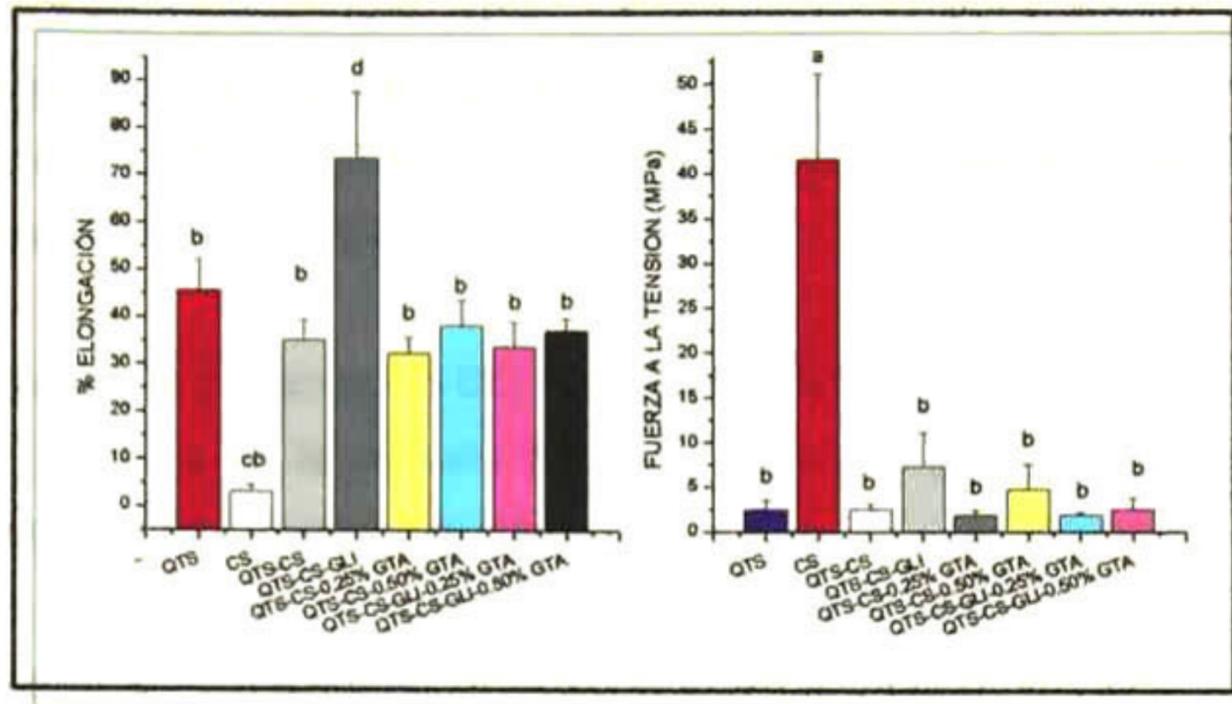


Figura 28. Porcentaje de elongación y fuerza a la tensión de películas.*

*Valores con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

La fuerza a la tensión de las películas de CS fue de 41.5 MPa y concuerda con lo reportado por Lima-Lima et al. [57] quienes observaron una fuerza a la tensión de 45.6 MPa en películas de CS acondicionadas a 75% HR.

Opuestamente al CS, la fuerza a la tensión de las películas de QTS fue 2.51 MPa. Este valor es considerablemente inferior a lo señalado en la literatura, tal es el caso del estudio realizado por Park et al. [58] quienes evaluaron el efecto de diferentes tipos de disolventes orgánicos sobre las propiedades mecánicas de películas de QTS con diferente peso molecular, encontrando valores de fuerza a la tensión desde 6.7 hasta 150.2 MPa.

Probablemente, los bajos valores de fuerza a la tensión se pueden explicar con base en las observaciones realizadas en SEM, donde las películas mostraron una baja continuidad en la red polimérica. Aunque ciertamente, el alto contenido de agua captado durante el proceso de acondicionamiento (75 %HR) influyó de forma considerable en la disminución de este parámetro.

Los valores de fuerza a la punción del resto de las películas fueron desde 1.83 hasta 7.31 MPa. Encontrándose que al comparar con las películas de QTS-CS la adición de 0.50% GTA causó un incremento en la fuerza a la de las películas desde 2.50 hasta 4.72 MPa.

Al parecer la presencia de GLI contribuyó a la formación de una red polimérica más continua en la película de QTS-CS lo que probablemente produjo un incremento en la fuerza a la tensión.

De entre las películas, la película de QTS-CS-GLI fue la más flexible ya que mostró el porcentaje de elongación más alto (73 %E), debido a la presencia del GLI que es un plastificante y cuya función es disminuir las fuerzas intermoleculares entre las cadenas poliméricas adyacentes provocando así la disminución de la fuerza a la tensión y el incremento de flexibilidad (%E) [5]. El resto de las películas presentaron valores de elongación de entre 32 a 45% por lo cual se concluyó que ni la incorporación de GTA ni de GLI mejoró la flexibilidad de las películas QTS-CS-GLI-GTA.

La comparación de películas plásticas comerciales con películas elaboradas a partir de biopolímeros se muestra en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Comparación de fuerza a la tensión de películas de empaque sintéticas y de películas elaboradas a base de biopolímeros.

MATERIAL	FUERZA A LA TENSIÓN (MPa)
Poliestireno (PS) ^a	41.3-51.7
Policloruro de vinilo (PVC) ^b	93.2
Polietileno de baja densidad (LDPE) ^a	6.2-17.2
Polietileno de alta densidad (HDPE) ^a	20-37.2
Polietilen tereftalato (PET) ^a	68.9
Polipropileno (PP) ^a	33-37.9
Quitosan-Konjac glucomanan ^c	72.5
Caseinato de sodio-Grasa de leche ^d	13
Gluten de trigo-Glicerol ^e	3
Caseinato de sodio-Glioxal ^f	26.8
Glutenina- Glutaraldehido ^f	9.1
QTS-CS (presente estudio)	2.51
QTS-CS-0.50%(w/w) GTA (presente estudio)	4.72

^a Södergård, A. [59]

^b Pérez-Pérez, C. [3]

^cXiao et al. [5]

^d Khwaldia, K. et al [26]

^eKhwaldia, K. et al. [26]

^fVaz et al.[2]

^gHernández-Muñoz et al. [6]

4.9 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

El Cuadro 14 muestra el espesor de las películas utilizadas en las pruebas de permeabilidad. Las películas de QTS y CS fueron las de menor espesor, estas diferencias fueron atribuidas a la cantidad de sólidos presentes en las soluciones filmogénicas y a la naturaleza de las moléculas empleadas.

Cuadro 14. Espesor de películas elaboradas a base de QTS y CS.*

MATERIAL	ESPESOR (μm)
QTS	17.75 ^b
CS	8.75 ^a
QTS-CS	24.25 ^{bcd}
QTS-CS-GLI	27.75 ^{cd}
QTS-CS-0.25%GTA	25.75 ^{cd}
QTS-CS-0.50%GTA	21.95 ^{bc}
QTS-CS-GLI-0.25%GTA	25.4 ^{cd}
QTS-CS-GLI-0.50%GTA	29.65 ^d

*Valores con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

La permeabilidad (P) esta definida como la tasa de transporte de un permeante (gas o vapor de agua) por unidad de área por la unidad del diferencial de presión del vapor bajo condiciones de temperatura y humedad específicas, dicho valor se multiplica por el espesor de la película. También, la P se puede calcular por el producto aritmético de la permeanza por el espesor de la película [60].

La permeabilidad al vapor de agua es un indicador de la habilidad del material para permitir el paso de vapor de agua a través de éste. Entre más baja la permeabilidad, mayor es la resistencia del material al paso del vapor de agua. Sin embargo, es importante señalar que los resultados de permeabilidad al vapor de agua (PVA) señalados en la literatura deben ser comparados con cautela puesto que los valores de las películas hidrofílicas son afectados por varios factores como es el método de medición, las condiciones de medición tal como el gradiente de humedad relativa (HR) y temperatura, la corrección del efecto de aire y el espesor de la película [58]. Por lo anterior, se ha propuesto el uso del término "Permeabilidad efectiva" o "Permeabilidad aparente" siendo únicamente válido en condiciones específicas de prueba y para espesores similares a los evaluados [61].

En general, las películas comestibles ofrecen una pobre barrera al vapor de agua en comparación con películas sintéticas Cuadro 15. La naturaleza hidrofílica de las proteínas incorporadas a las películas comestibles interactúa con el agua, causando hinchamiento y la desviación de la ley de Fick [25]. En un proceso de hinchamiento se detectan cambios conformacionales en la microestructura de la película que no únicamente incrementa la humedad de sorción de la película, sino también crean canales en la estructura polimérica lo que permite un mayor flujo de permeante. El incremento de la solubilidad de vapor de agua provoca un incremento en la permeabilidad del vapor de agua [62].

Cuadro 15. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de películas sintéticas y películas elaboradas a base de biopolímeros.

MATERIAL	CONDICIONES DE PRUEBA (°C, %HR)	PVA (mol.m.m ⁻² .s ⁻¹ .Pa ⁻¹)
PVDC (Polivinil) ^a		0.0123x10 ⁻¹²
LDPE (Polietileno de bajo densidad) ^a	27.6;0/100	0.0201x10 ⁻¹²
Poliéster ^a	25;0/100	1.08x10 ⁻¹²
Cera de abeja ^a	25.9;0/100	0.0571x10 ⁻¹²
Suero de leche:Glicerol (15:1) ^a	26.3;0/88	29.2x10 ⁻¹²
QTS (disuelto en ác. acético) ^b	25; 50	17.7x 10 ⁻¹²
CS ^c	20; 90	2.70x10 ⁻¹²
CS:Glicerol (100:10) ^c	20; 90	8.88x10 ⁻¹²

^aKhwaldia et al. [25]

^bPark et al. [58]

^cKhwaldia et al. [26]

En el presente trabajo las pruebas de permeabilidad se realizaron a 22 °C y a 65 %HR donde se observó que de entre las películas evaluadas las películas de CS y QTS mostraron las PVA más bajas (2.50x10⁻¹² y 4.73x10⁻¹² mol.m.m⁻².s⁻¹.Pa⁻¹, respectivamente); las PVA del resto de las películas se ubicaron en el intervalo de 5.29 x10⁻¹² a 6.13 x10⁻¹² mol.m.m⁻².s⁻¹.Pa⁻¹

De lo anterior, se concluye que las películas preparadas a base de la mezcla QTS y CS ofrecen una pobre barrera al vapor de agua.

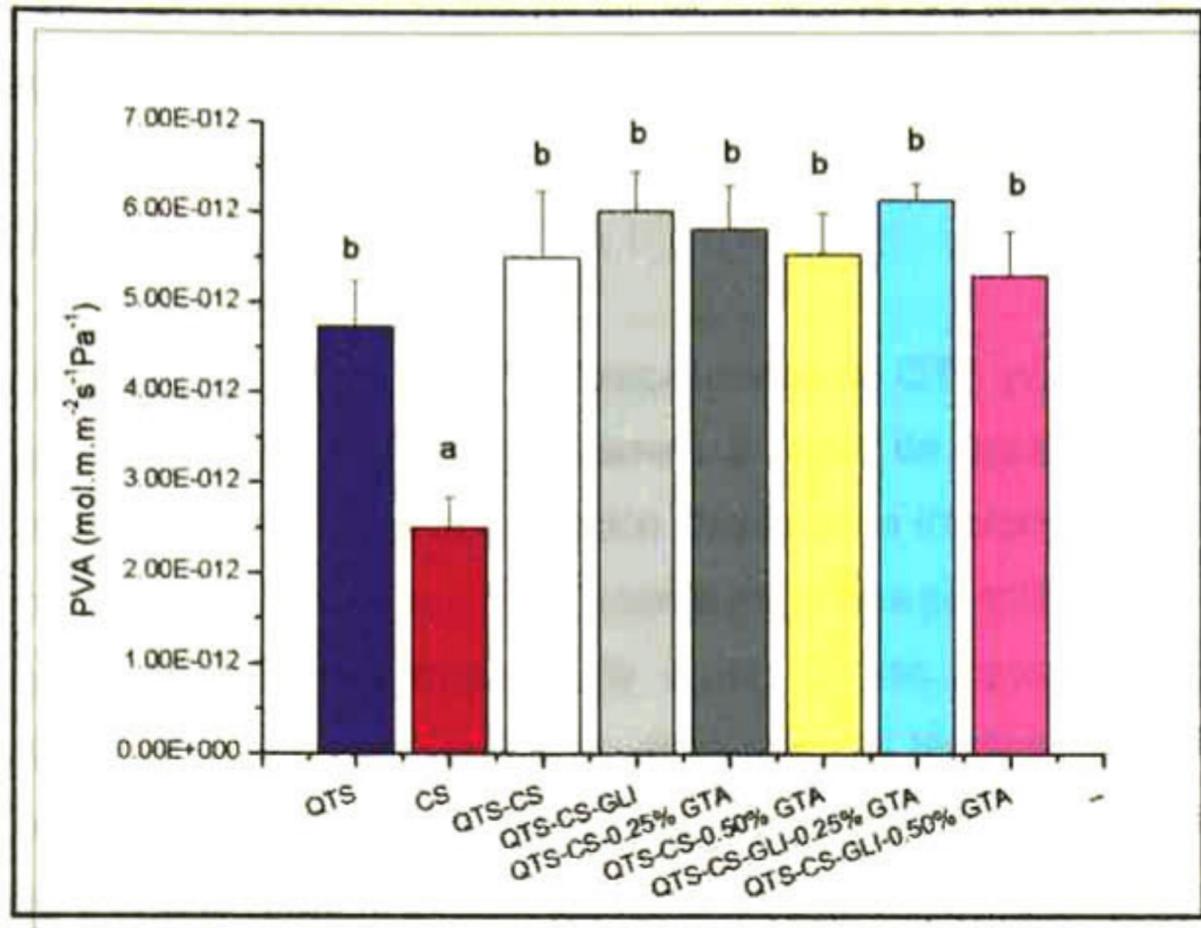


Figura 29. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) a través de las diferentes películas preparadas (Condiciones de evaluación: 17-22 °C y 63-65 %HR).*

*Valores con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Se observaron diferencias significativas en las películas elaboradas a base de la mezcla de QTS y CS (Figura 29). Sin embargo, la adición de GLI en las películas incrementó los valores de PVA puesto que son modificadas las características físicas de una red polimérica adicionada con plastificantes, esto es, se presenta una mayor movilidad polimérica, los coeficientes de fricción son reducidos y por consecuencia existe un aumento del volumen libre lo que permite un mayor paso de las moléculas de agua a través de las películas [3]. Estas variaciones se confirmaron por la disminución de la temperatura de transición vítrea (T_g) de los materiales.

La adición de 0.50% GTA provocó disminuciones, no significativas, en los valores de PVA. Generalmente un proceso de entrecruzamiento provoca un mejoramiento en las propiedades de barrera, tal fue el caso de las películas fabricadas a base de glutenina las cuales fueron tratadas con diferentes agentes entrecruzantes: formaldehído (FA), glutaraldehído (GTA) y glioxal (GLY) [6].

En ambos casos, ni la mezcla de los biopolímeros de QTS y CS o la adición de GTA mejoraron las propiedades de barrera al vapor de agua de las películas. Este fenómeno se atribuyó a la formación de espacios intersticiales, esto es, se incrementó el volumen libre en la red polimérica lo que permitió el transporte de una mayor cantidad de moléculas de agua. Dichos espacios intersticiales fueron observados en las películas mediante la técnica de microscopia electrónica de barrido (SEM). Un comportamiento similar fue citado por Hernández-Muñoz et al. [6] en películas elaboradas a base de proteína de soya adicionadas de almidón oxidado (un polímero aldehídico).

5. CONCLUSIONES

- Mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) e infrarrojo (IR) se sugiere la fuerte interacción química entre el QTS y CS, esto es, la mezcla de ambos biopolímeros involucró la formación de puentes salinos y puentes de hidrógeno. No obstante, no se logró identificar con exactitud las parejas de grupos funcionales que interaccionaron debido a la similitud de los grupos funcionales de ambos biopolímeros.
- El GTA favoreció el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas del QTS y CS, es muy probable la interacción de los grupos aldehídos terminales del GTA con los grupos aminos protonados presentes en el sistema QTS-CS. Esto es, a través de RMN e IR se observaron modificaciones localizadas en el C-2 y C-3/C-6 de la unidad estructural del QTS.
- Con base en la caracterización de las películas de QTS-CS-GTA se concluye que la adición de 0.50% (w/w) de GTA al sistema QTS-CS provocó un mayor grado de entrecruzamiento entre las cadenas.
- La matriz polimérica de las películas estuvo conformada por gránulos porosos de forma irregular de 5-10 μm de tamaño.
- A través de la técnica de difracción de R-X, se encontró que el patrón de difracción de las películas de QTS es un material semi-cristalino, con una banda intensa en 10.48°
- Debido a la interacción química entre el QTS y CS, tanto las películas preparadas a partir de la mezcla QTS-CS como las preparadas con QTS-CS-GTA fueron amorfas.

- Con el análisis termogravimétrico se determinó que la temperatura de descomposición del QTS y CS fue de 256.14 y 283.28 °C, respectivamente.
- Las películas preparadas a partir de la mezcla QTS-CS no fueron térmicamente más estables que sus componentes individuales puros (273.17 °C).
- La película de QTS-CS-0.50% (w/w) GTA mostró una mayor temperatura de descomposición (278.71 °C) por tanto la presencia de GTA mejoró la estabilidad térmica del sistema QTS-CS.
- Del análisis térmico con DSC modulado, se encontró que la temperatura de transición vítrea (T_g) de las películas QTS-CS fue de 168 °C.
- La T_g más alta se observó en la película de QTS-CS-0.50% (w/w) GTA (179.37 °C) debido al alto grado de entrecruzamiento.
- Las fuertes interacciones químicas entre el QTS-CS provocaron una alta fuerza a la punción (123.30 N/mm). Sin embargo, estas presentaron una baja fuerza a la tensión (2.51 MPa) y una baja capacidad de estiramiento (33 % Elongación).
- La incorporación de GTA no mejoró las propiedades mecánicas de las películas, es decir, ni la fuerza a la tensión ni el porcentaje de elongación.
- La permeabilidad al vapor de agua del QTS y CS fue de 2.50×10^{-12} y 4.73×10^{-12} mol.m.m⁻².s⁻¹.Pa⁻¹, respectivamente.
- Al comparar con las películas de QTS y CS, las películas preparadas de la mezcla de QTS-CS y QTS-CS-GTA ofrecen una pobre barrera al

vapor de agua (PVA) desde 5.29×10^{-12} hasta 6.13×10^{-12} $\text{mol.m.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$.

- La adición de GLI tanto a la mezcla de QTS-CS como a la mezcla QTS-CS-GTA tuvo como único efecto la disminución de las interacciones entre las cadenas poliméricas, es decir, provocó un mayor "desorden" estructural que se manifestó en los resultados de las propiedades térmicas y mecánicas de las películas así como en las propiedades de barrera al vapor de agua.

6. PERSPECTIVAS

Con el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de los biopolímeros QTS y CS se logró obtener una película de bajo costo, de origen natural y con adecuadas propiedades mecánicas y térmicas. Abriéndose así un campo de estudio muy amplio en el área de biomateriales en cuanto a posibles aplicaciones.

Las películas de QTS-CS son un candidato adecuado para su uso como parches médicos en heridas cutáneas. Por tanto, es necesario realizar varios estudios de biocompatibilidad con el tejido cutáneo así como de biodegradabilidad del material para comprobar su capacidad como biomaterial.

7. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Cheng M., Deng J., Yang F., Gong Y., Zhao N. and Zhang X., Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials* 24 (2003) 2871-2880
2. Vaz C.M., De Graaf A., Reis R.L. and Cunha A.M., Effect of crosslinking, thermal treatment and UV irradiation on the mechanical properties and *in vitro* degradation behavior of several natural proteins aimed to be used in the biomedical field. *J. Mater. Sci. Mat. Med.* 14 (2003) 789-796
3. Pérez-Pérez. M.C. Structure et propriétés mécaniques et de transfert des films comestibles à base de caséinate de sodium. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine. Spécialité: Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. 2001
4. Yan X.L., Khor E. and Lim L.Y., Chitosan-Alginate films prepared with chitosans of different molecular weights. *J Biomed Mater Res.* 58(4) (2001) 358-65
5. Xiao C., Gao S., Wang H. and Zhang L., Blend films from chitosan and konjac glucomannan solutions. *J. Appl. Polym. Sci.* 76 (2000) 509-515
6. Hernández-Muñoz P., Villalobos R. and Chiralt A., Effect of cross-linking using aldehydes on properties of glutenin-rich films. *Food hydrocolloids* 18 (2004) 403-411
7. Voet, Voet, and Pratt, *Fundamentals of Biochemistry*, John Wiley and Sons. (2002)
8. Park K., Shalaby W.S.W., and Park H., *Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery*, Lancaster, PA, Technomic, 1993 pp. 45-47
9. Vila Jato J.L., *Tecnología Farmacéutica Vol I: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*. Editorial Síntesis. Madrid. 1997
10. Singh, D.K. and Ray, A.O. Biomedical applications of chitin, chitosan and their derivatives. *J. Macromol. Sci., Part C- Reviews in Macromol. Chem.Phys.* 40(1) (2000) 69-83
11. Mao J.S., Liu H.F., Yin Y.J. and Yao K.D., The properties of chitosan-gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. *Biomaterials* 24 (2003) 1621-1629
12. Francis Suh, J.K. and Matthew H.W.T., Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 21 (2000) 2589-2598

13. Velázquez-Morales P., Synthèse et caractérisation de nouveaux électrolytes polymères à base de chitosane. Pour obtenir le titre de Docteur de l'Institut National Polytechnique de Grenoble. Spécialité: Sciences et Génie de Matériaux. 1997
14. Saïto H., Tabeta R. and Ogawa K., High-Resolution solid-state ^{13}C NMR study of chitosan and its salts with acids: conformational characterization of polymorphs and helical structures as viewed from the conformation-dependent ^{13}C chemical shifts. *Macromolecules* 20 (1987) 2424-2430
15. Domard A. and Domard M., Chitosan: Structure—Property Relationship and Biomedical Applications In: *Polymeric Biomaterials* 2nd Edition. Published by the Marcel Dekker. (2001), Dimitriu, S (ed). 187-212
16. Barreto P.L.M., Pires A.T.N. and Soldi V., Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polym. Degrad, Stab.* 79 (2003) 147-152
17. Kalichevsky M.T., Blanshard J.M.V. and Tokarczuk P.F., Effect of water content and sugars on the glass transition of casein and sodium caseinate. *Int. J. Food Sci. Technol.* 28 (1993) 139-151
18. Chu B., Zhou Z., Wu G. and Farrell H.M, Jr., Laser light scattering of model casein solutions: Effects of high temperature. *J. Colloid Interface Sci.* 170 (1995) 102-112
19. Curley D.M., Kumosinski T.F., Unruh J.J. and Farrell H.M., Jr., Changes in the secondary structure of bovine casein by Fourier transform infrared spectroscopy: Effects of calcium and temperature. *J. Dairy Sci.* 81 (1998) 3154-3162
20. Ribeiro K.O., Rodrigues M.I., Sabadini E. and Cunha R.L., Mechanical properties of acid sodium caseinate- κ -carrageenan gels: effect of co-solute addition. *Food Hydrocolloids* 18 (2004) 71-79
21. Barreto P.L.M., Roeder J., Crespo J.S., Maciel G.R., Terenzi H., Pires A.T.N. and Soldi V., Effect of concentration, temperature and plasticizer content on rheological properties of sodium caseinate and sodium caseinate/sorbitol solutions and glass transition of their films. *Food Chem.* 82 (2003) 425-431
22. Casanova H. and Dickinson E., Influence of protein interfacial composition on salt stability of mixed casein emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 72-76
23. Jahaniaval F., Kakuda Y., Abraham V. and Marccone M.F., Soluble protein fractions from pH and heat treated sodium caseinate: physicochemical and functional properties. *Food Research International* 33 (2000) 637-647

24. Gou M.R., Fox P.F., Flynn A. and Kindstedt P.S., Heat-induced modifications of the functional properties of sodium caseinate. *Int. Dairy Journal* 6 (1996) 473-483
25. Khwaldia K., Banon S., Perez C. and Desobry S., Properties of sodium caseinate film-forming dispersions and films. *J. Dairy Sci.* 87 (2004) 2011-2016
26. Khwaldia K., Banon S., Desobry S. and Hardy J., Mechanical and barrier properties of sodium caseinate-anhydrous milk fat edible films. *Int. J. Food Sci. Technol.* 39 (2004) 403-411
27. Folegatti M.I.S., Antunes A.J. and Marcondes J.A., Mechanical and Permeability Properties of Milk Protein Films. *Brazilian archives of biology and technology* 41-3 (1998) 320-328
28. Ausar S.F., Bianco I.D., Badini R.G., Castagna L.F., Modesti N.M., Landa C.A. and Beltramo D.M., Characterization of casein micelle precipitation by chitosans. *J. Dairy Sci.*, 84 (2001) 361-369
29. Ma L., Gao C., Mao Z., Zhou J., Shen J., Hu X. and Han C., Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials* 24 (2003) 4833-4841
30. Oyrton A.C., Monteiro Jr. and Airoidi C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *Int J. Biol. Macromol.* 26 (1999) 119-128.
31. Latha M.S. and Jayakrishnan A., Glutaraldehyde cross-linked bovine casein microspheres as a matrix for the controlled release of theophylline: In vitro studies. *J. Pharm. Pharmacol.* 46 (1994) 8-13
32. ASTM. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. D882-88. In Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. 1989
33. ASTM. Standard test method for water vapor transmission of materials. E96-80. In Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. 1980
34. Kam H.M., Khor E. and Lim L.E., Storage of partially deacetylated chitosan films. *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* 48 (1999) 881-888
35. Fernández-Cervera M., Heinämäki J., Krogars K., Jörgensen A.C., Karjalainen M., Iraizoz-Colarte A. and Yliruusi J., Solid-state and mechanical properties of aqueous chitosan-amylose starch films plasticized with polyols. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 5(1) (2001) 1-6

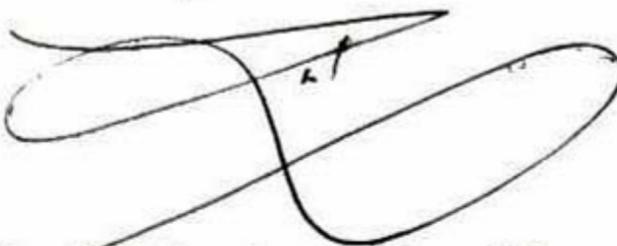
36. ter Beek L.C., Ketelaars M., Mc Cain D.C., Smulder P.E., Walstra P and Hemminga M.A., Nuclear magnetic resonance study of the conformation and dynamics of beta-casein at the oil/water interface in emulsions. *Biophysical Journal* 70 (1996) 2396-2402
37. Vishu Kumar A.B., Gowda L.R. and Tharanathan R.N., Non-specific depolymerization of chitosan by pronase and characterization of the resultant products. *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 713-723
38. Silverstein R.M., Bassler C. and Morrill T., Spectrometric identification of organic compounds. John Wiley & Sons, Inc., Fifth edition 1991
39. Yin Y.J., Yao K.D., Cheng G.X. and Ma J.B., Properties of polyelectrolyte complex films of chitosan and gelatin. *Polym Int.* 48 (1999) 429-433
40. Taravel M.N. and Domard A., Collagen and its interaction with chitosan. II. Influence of the physicochemical characteristics of collagen. *Biomaterials* 16 (11) (1995) 865-871
41. Ogawa K., Yui T. and Okuyama K., Molecular conformations of chitin and chitosan. *Foods Food Ingredients J. Jpn.*, 209 (4) (2004)
42. Qu X., Wirsen A. and Albertsson A.C., Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behavior and states of water. *Polymer* 41 (2000) 4589-4598
43. Zong Z., Kimura Y., Takahashi M. and Yamane H., Characterization of chemical and solid state structures of acylated chitosans. *Polymer* 41 (2000) 899-906
44. Pa J.H. and Yu T.L., Light scattering study of chitosan in acetic acid aqueous solutions. *Macromol. Chem. Phys.* 202 (2001) 985-991
45. Najgebauer D., Grega T., Sady M. and Tomasik P., Polymeric complexes of cornstarch and waxy cornstarch phosphates with milk casein and their performance as biodegradable materials. *Molecules* 9 (2004) 550-567
46. Zaleska, H, Ring S. and Tomasik, P., Electrosynthesis of potato starch-casein complexes. *Int. J. Food Sci Technol.* 36 (2001) 509-515
47. Thermal Analysis UserCom 10. Mettler Toledo
48. Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry, Vol 1: Principles and Practice" edited by Michael Brown and published by Elsevier in 1998
49. Sakurai K., Maegawa T. and Takahashi T., Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer* 41 (2000) 7051-7056

50. Flores-Ramírez N., Elizalde-Peña E.A., Vásquez-García S.R., González-Hernández J., Martínez-Ruvalcaba A., Sanchez I.C., Luna-Bárcena G. and Gupta R.B., Characterization and degradation of functionalized chitosan with glycidyl methacrylate. *J. Biomater. Sci. Polymer* In Press
51. Dong Y., Ruan Y., Wang H., Zhao Y. and Bi D., Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques. *J. Appl. Polymer Sci.*, 93 (2004) 1553-1558
52. Sandler S., Karo W., Bonesteel J.A. and Pearce E.M., Polymer synthesis and characterization a laboratory manual. Academic Press. 1998
53. Zivanovic S., Chi S. and Draughon A.E., Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *J. Food Sci.* 70 (1) (2005) M45-M51
54. Banerjee R. and Chen H., Functional properties of edible films using whey protein concentrate. *J. Dairy Sci.* 78 (1995) 1673-1683
55. Gnanasambandam R., Hettiarachchy N.S. and Coleman M., Mechanical properties and barrier of rice bran films. *J. Food Sci.* 62 (2) (1997) 395-398
56. Cao Y.M. and Chang K.C., Edible films prepared from water extract of soybeans. *J. Food Sci.* 67 (4) (2001) 1449-1454
57. Lima-Lima E., Altamirano-Roma S., Rivas-Araiza R., Luna-Bárcenas G. and Pérez-Pérez C., Physical and physico-chemical properties of sodium caseinate based films as affected by plasticizer content. *Food Science and Biotechnology in developing countries*. FSB1-2004
58. Park S.Y., Marsh K.S. and Rhim J.W., Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. *J. Food Sci.* 67 (1) (2002) 194-197
59. Södergård, A. Lactic acid based polymers for packaging materials for the food industry. The Food Biopack Conference. Conference Proceeding. Copenhagen, Denmark 27-29. August 2000.
60. Cooksey K., Marsh K.S. and Doar L.H., Predicting permeability and transmission rate for multilayer materials. *FoodTechnology.* 53(9) (1999) 60-63
61. Miranda P.S., Garnica O., Lara-Sagahon V. and Cárdenas G., Water vapor permeability and mechanical properties of chitosan composite films. *J. Chil. Chem. Soc.* 49 (2) (2004) 173-178

EL JURADO DESIGNADO POR LA UNIDAD QUERETARO DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL, APROBÓ LA TESIS DE LA C. ROCIO NOHEMI RIVAS ARAIZA TITULADA: "ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES MOLECULARES DEL SISTEMA QUITOSAN-CASEINATO DE SODIO", FIRMAN AL CALCE DE COMUN ACUERDO LOS INTEGRANTES DE DICHO JURADO, EN LA CIUDAD DE SANTIAGO DE QUERETARO, QRO., AL PRIMER DIA DEL MES DE MARZO DEL DOS MIL CINCO.



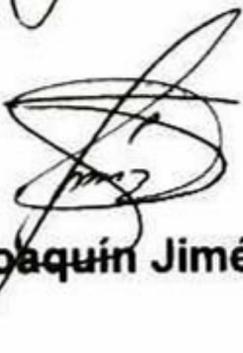
Dr. Gabriel Luna Bárcenas



Dra. Ma. Cristina Irma Pérez Pérez



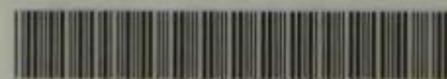
Dr. Fernando Martínez Bustos



Dr. Sergio Joaquín Jiménez Sandoval



CINVESTAV
BIBLIOTECA CENTRAL



SS1T000008063