



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y
MECÁNICA**

CARRERA DE INGENIERÍA MECÁNICA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERO MECÁNICO**

**TEMA: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FIBRAS
SUBMICROMÉTRICAS DE QUITOSANO MEDIANTE LA TÉCNICA DE
ELECTROHILADO**

AUTORES:

GRANJA TAPIA, ANA GABRIELA

HERRERA CARRILLO, DIEGO FERNANDO

DIRECTOR:

ING. NARVÁEZ MUÑOZ, CHRISTIAN PATRICIO, MPhil.

SANGOLQUÍ – ECUADOR

2018



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA
CARRERA DE INGENIERÍA MECÁNICA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FIBRAS SUBMICROMÉTRICAS DE QUITOSANO MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELECTROHILADO**" fue realizado por los señores **Granja Tapia, Ana Gabriela** y **Herrera Carrillo, Diego Fernando**, el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustenten públicamente.

Sangolquí, 06 de julio de 2018

Firma:

ING. CHRISTIAN PATRICIO NARVÁEZ MUÑOZ, MSC.

C.C. 1720037165



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA
CARRERA DE INGENIERÍA MECÁNICA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Nosotros, *Granja Tapia, Ana Gabriela y Herrera Carrillo, Diego Fernando*, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: ***Obtención y caracterización de fibras submicrométricas de quitosano mediante la técnica de electrohilado*** es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 06 de julio de 2018

Srta. Ana Gabriela Granja Tapia

CI: 1722243803

Sr. Diego Fernando Herrera Carrillo

CI: 1719135301



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA
CARRERA DE INGENIERÍA MECÁNICA

AUTORIZACIÓN

Nosotros, *Granja Tapia, Ana Gabriela* y *Herrera Carrillo, Diego Fernando*, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: *Obtención y caracterización de fibras submicrométricas de quitosano mediante la técnica de electrohilado* en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 06 de julio de 2018

Srta. Ana Gabriela Granja Tapia

CI: 1722243803

Sr. Diego Fernando Herrera Carrillo

CI: 1719135301

DEDICATORIA

A Dios que con sus bendiciones en los momentos difíciles tuve la fortaleza para día a día seguir adelante, durante esta etapa de formación que me permitió culminar y cumplir con mis objetivos y metas propuestas

A mis padres Cecilia Tapia y Wilson Granja, pilar fundamental en mi vida, que con su amor, comprensión y apoyo supieron guiarme , inculcándome responsabilidad, constancia, dedicación , valores éticos y morales, me enseñaron que con esfuerzo todo es posible de alcanzar

A mi hermano Lenin Granja, que con su amor paciencia y comprensión ha ido formándome como una persona constante y perseverante, me enseñó que cada día es una oportunidad más para seguir adelante, que a pesar de las dificultades, siempre pude contar con él para resolverlo

A mi Tío y padrino Gerardo Granja, que desde el cielo me ha dado fuerzas para poder culminar con mis metas, aunque no estés presente físicamente, siempre estarás en mi corazón.

A mis tíos Rocío, Marcelo y Eugenia, por estar pendiente de mí, por alegrarse en mis triunfos y apoyarme en mis derrotas.

Al amor de mi vida Diego Herrera, por su apoyo incondicional y el amor que me ha dado durante estos años, por darme fuerzas cuando más lo necesitaba, por recordarme que todo lo que me propongo, lo puedo cumplir. A su familia por el apoyo y el cariño que me han brindado.

A mis hermanos Lenin, Alexandra, Santiago, David y Byron, por siempre brindarme una mano cuando más lo he necesitado.

A toda mi familia y amigos, que siempre han estado a mi lado en los buenos y en los difíciles momentos

A mis profesores que han sabido dejar su granito de enseñanza en mí, durante todos estos años de estudio.

Gabriela Granja

DEDICATORIA

A Dios, por la vida, por colmarme de bendiciones, por darme la fuerza e inteligencia para superar las dificultades así como por brindarme momentos llenos de felicidad.

A mis abuelitos Gloria y Jorge, por su cariño y enseñanzas, por estar conmigo en cada paso que doy, por cuidarme y bendecirme desde el cielo.

A mi madre Paty y a mi hermano Andrés por ser mis pilares, mi fortaleza y mi sustento, por su amor y apoyo, por estar siempre a mi lado, por levantarme cuando he caído, por nunca desfallecer y enseñarme que con esfuerzo y dedicación podré cumplir mis metas y sueños. Porque sin ellos no sería la persona que soy.

A toda mi familia, especialmente a mis tías, por estar presentes cuando más lo necesitaba, por su cobijo, paciencia y cariño.

A Gaby, mi amor, por estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos, por brindarme su amor y apoyo incondicional, por sus palabras de aliento y sus consejos, por ser mi compañera en este arduo camino que nos ha tocado recorrer. A su familia, por la confianza y el apoyo.

A mis amigos por formar parte de mi vida y hacer de cada momento una experiencia inolvidable.

A mis compañeros y profesores por sus enseñanzas y apoyo.

A todos, muchas gracias.

Diego Herrera

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida y las personas que nos han brindado su apoyo para la culminación de nuestros propósitos.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, al Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica, a los docentes y especialmente al laboratorio de reología y microscopía (CENCINAT) que han colaborado en la realización de este proyecto.

Al director del proyecto el Ing. Christian Narváez, por todo el apoyo que día a día nos brindó para nuestra formación y la culminación de este proyecto.

A nuestro compañero y amigo el Ing. Gabriel Melo por sus consejos y colaboración que han sido invaluable en la realización de este proyecto.

Al Senescyt y la Beca Ensamble por brindar el auspicio al proyecto macro “Electrospinning de fibras micrométricas de fribroína de seda y quitosán: biopolímeros producidos en el Ecuador”, del que forma parte el presente proyecto de Titulación.

A nuestros padres, hermanos, familiares, amigos y a todas las personas que han sido parte de nuestras vidas, por todo el apoyo incondicional que han sabido brindarnos.

Gabriela y Diego

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|------|
| CERTIFICACIÓN..... | I |
| AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD..... | II |
| AUTORIZACIÓN..... | III |
| DEDICATORIA..... | IV |
| DEDICATORIA..... | V |
| AGRADECIMIENTOS..... | VI |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS..... | VII |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | IX |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | X |
| RESUMEN..... | XII |
| ABSTRACT..... | XIII |
| CAPÍTULO I..... | 1 |
| GENERALIDADES..... | 1 |
| 1.1. Introducción..... | 1 |
| 1.2. Antecedentes..... | 4 |
| 1.3. Definición del Proyecto..... | 9 |
| 1.4. Objetivos..... | 12 |
| 1.4.1. <i>Objetivo General</i> | 12 |
| 1.4.2. <i>Objetivos Específicos</i> | 12 |
| 1.5. Justificación e Importancia..... | 13 |
| 1.6. Alcance..... | 15 |
| CAPÍTULO II..... | 17 |
| ESTADO DEL ARTE..... | 17 |
| 2.1. Electrohilado..... | 17 |
| 2.1.1. Parámetros..... | 19 |
| 2.2. Quitosano..... | 21 |
| 2.3. Electrohilado de quitosano..... | 33 |
| 2.4. Sangre de drago..... | 40 |
| CAPITULO III..... | 42 |
| EXPERIMENTACIÓN..... | 42 |
| 3.1. Materiales..... | 42 |
| 3.1.1. Quitosano..... | 42 |
| 3.1.2. Polivinil Alcohol (PVA)..... | 43 |
| 3.1.3. Ácido Acético Glacial (CH ₃ COOH)..... | 43 |
| 3.1.4. Sangre de Drago..... | 44 |
| 3.2. Equipos e instrumentos..... | 45 |
| 3.3. Sistema de electrohilado..... | 46 |
| 3.4. Metodología de trabajo..... | 47 |

| | |
|--|-----|
| 3.4.1. Preparación de la solución CS/PVA..... | 48 |
| 3.4.1.1. Preparación de la solución de quitosano (CS)..... | 48 |
| 3.4.1.2. Preparación de la solución de PVA..... | 50 |
| 3.4.2. Preparación de la solución de CS/PVA/SD..... | 51 |
| 3.4.3. Electrohilado de la solución | 52 |
| 3.4.4. Caracterización..... | 53 |
| 3.4.4.1. Caracterización morfológica | 53 |
| 3.4.4.2. Caracterización reológica | 54 |
| CAPITULO IV | 56 |
| ANÁLISIS DE RESULTADOS | 56 |
| 4.1. Solubilidad del quitosano..... | 56 |
| 4.2. Membranas de CS en AA+ PVA..... | 57 |
| 4.2.1. Electrohilabilidad..... | 57 |
| 4.2.2. Análisis Morfológico | 61 |
| 4.2.2.1. Manteniendo constante las concentraciones de CS (4% w/v) en solución de ácido acético + PVA (10% w/v) en agua destilada..... | 61 |
| 4.2.2.2. Manteniendo constante las concentraciones de CS (4% w/v) en ácido acético + PVA (8% w/v) en agua..... | 65 |
| 4.2.2.3. Manteniendo constante las concentraciones de PVA (10% w/v) en agua y ácido acético (70% v/v) en agua | 68 |
| 4.2.2.4. Comportamiento de las fibras, variando parámetros del proceso de electrohilado utilizando: CS 2% w/v en Ácido acético 70% v/v + PVA 10% w/v en agua | 74 |
| 4.2.3. Análisis reológico | 79 |
| 4.2.3.1. Graficas: Viscosidad vs Tasa de cizallamiento y Esfuerzo de corte vs Tasa de cizallamiento..... | 80 |
| 4.2.3.2. Graficas comparativas: Viscosidad vs Tasa de cizallamiento | 84 |
| 4.3. Solubilidad de Sangre de Drago en solución CS/PVA..... | 87 |
| 4.4. Membranas de CS en AA + PVA + SANGRE DE DRAGO | 88 |
| 4.4.1. Electrohilabilidad..... | 88 |
| 4.4.2. Análisis morfológico | 91 |
| 4.5. Membranas con quitosano ecuatoriano..... | 92 |
| CAPITULO V | 96 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 96 |
| 5.1. Conclusiones..... | 96 |
| 5.2. Recomendaciones..... | 100 |
| 5.3. Trabajos futuros | 101 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 103 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. <i>Propiedades de la solución e influencia en el proceso de electrohilado</i> | 20 |
| Tabla 2. <i>VARIABLES de control del proceso de electrohilado</i> | 21 |
| Tabla 3. <i>Fuentes de Quitina y Quitosano</i> | 24 |
| Tabla 4. <i>Algunas propiedades físico – químicas de la quitina y el quitosano</i> | 27 |
| Tabla 5. <i>Principales aplicaciones del quitosano.</i> | 32 |
| Tabla 6. <i>Variación de parámetros (primera aproximación)</i> | 58 |
| Tabla 7. <i>Variación de parámetros (segunda aproximación)</i> | 59 |
| Tabla 8. <i>Variación de parámetros (tercera aproximación)</i> | 60 |
| Tabla 9. <i>Parámetros del proceso (CS 4% en AA 50% + PVA 10%)</i> | 61 |
| Tabla 10. <i>Parámetros del proceso (CS 4% en AA 60% + PVA 10%)</i> | 62 |
| Tabla 11. <i>Parámetros del proceso (CS 4% en AA 70% + PVA 10%)</i> | 63 |
| Tabla 12. <i>Parámetros del proceso (CS 4% en AA 50% + PVA 8%)</i> | 65 |
| Tabla 13. <i>Parámetros del proceso (CS 4% en AA 60% + PVA 8%)</i> | 66 |
| Tabla 14. <i>Parámetros del proceso (CS 4 en AA 70 + PVA 8%)</i> | 67 |
| Tabla 15. <i>Parámetros del proceso (CS 2% en AA 70% + PVA 10%)</i> | 68 |
| Tabla 16. <i>Parámetros del proceso (CS 6% en AA70 + PVA 10%)</i> | 70 |
| Tabla 17. <i>Parámetros del proceso (CS 8% en AA 70% + PVA 10%)</i> | 71 |
| Tabla 18. <i>Parámetros del proceso (CS 10% en AA 70% + PVA 10%)</i> | 72 |
| Tabla 19. <i>Parámetros que marcan los límites del proceso de electrohilado para solución CS 2% w/v en ácido acético 70% v/v + PVA 10% w/v</i> | 76 |
| Tabla 20. <i>Parámetros del proceso (CS 2% en AA 70% + PVA 10%) + SD 40%, 3:1</i> ... | 91 |
| Tabla 21. <i>Resultados obtenidos con quitosano ecuatoriano</i> | 93 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| <i>Figura 1.</i> Nanofibras de Ag-quitosano/PEO con AgNO ₃ al 8% | 7 |
| <i>Figura 2.</i> Crecimiento celular en las nanofibras de poliamida-6/quitosano con una concentración de quitosano al 2%. | 8 |
| <i>Figura 3.</i> Aparato experimental utilizado por Baumgarten..... | 10 |
| <i>Figura 4.</i> Número de publicaciones científicas con la palabra “electrospinning” o “electrospun” | 14 |
| <i>Figura 5.</i> Electrohilado..... | 18 |
| <i>Figura 6.</i> Campos de aplicación de la tecnología de electrospinning (gama de productos ofertada por eSpin Technologies). a),b) y c) filtración molecular, de agua y aire, respectivamente; d) apósitos, vendas; e) textiles; f) biomedicina | 19 |
| <i>Figura 7.</i> Estructura química de la quitina y el quitosano | 22 |
| <i>Figura 8.</i> Microscopias de fibras electrohiladas de quitosano con diferentes pesos moleculares: a) 30000 g/mol, 10%; b) 106000 g/mol, 7% y c) 398000 g/mol, 2.5%. | 36 |
| <i>Figura 9.</i> Fotografías SEM de nanofibras con diferentes relaciones de masa CS/PVA cuando la concentración de AA fue del 4%: (a) 90:10, (b) 80:20, (c) 70:30, (d) 60:40 y (e) 50:50. El voltaje de electrohilado fue de 29 kV. | 37 |
| <i>Figura 10.</i> Fotografías SEM de nanofibras con diferentes relaciones de masa CS/PVA cuando la concentración de AA fue del 90%: (a) 95:5, (b) 90:10, (c) 80:20, (d) 70:30, (e) 60:40, y (f) 50: 50. El voltaje de electrohilado fue de 18 kV. | 38 |
| <i>Figura 11.</i> Sangre de drago..... | 40 |
| <i>Figura 12.</i> Quitosano en polvo..... | 42 |
| <i>Figura 13.</i> PVA en gránulos..... | 43 |
| <i>Figura 14.</i> Ácido acético glacial | 44 |
| <i>Figura 15.</i> Sangre de drago..... | 44 |
| <i>Figura 16.</i> Equipos utilizados, a) balanza electrónica, b) placa de calentamiento y agitación. | 45 |
| <i>Figura 17.</i> Sistema de electrohilado | 46 |
| <i>Figura 18.</i> Diagrama de flujo de la experimentación | 47 |
| <i>Figura 19.</i> Soluciones de quitosano a diferentes concentraciones..... | 49 |
| <i>Figura 20.</i> Solución de PVA (10%). | 51 |
| <i>Figura 21.</i> Microscopio electrónico de barrido (SEM)..... | 54 |
| <i>Figura 22.</i> Reómetro TA Instruments. | 54 |
| <i>Figura 23.</i> Gráfica: tiempo vs concentración de AA..... | 56 |

| | |
|--|----|
| <i>Figura 24.</i> Membrana recolectada sobre gasa | 60 |
| <i>Figura 25.</i> Resultados del proceso (CS 4% en AA 50% + PVA 10%) | 61 |
| <i>Figura 26.</i> Resultados del proceso (CS 4% en AA 60% + PVA 10%) | 62 |
| <i>Figura 27.</i> Resultados del proceso (CS 4% en AA 70% + PVA 10%) | 63 |
| <i>Figura 28.</i> Resultados del proceso (CS 4% en AA 50% + PVA 8%) | 65 |
| <i>Figura 29.</i> Resultados del proceso (CS 4% en AA 60% + PVA 8%) | 66 |
| <i>Figura 30.</i> Resultados del proceso (CS 4 en AA 70 + PVA 8%)..... | 67 |
| <i>Figura 31.</i> Resultado del proceso (CS 2% en AA 70% + PVA 10%) | 69 |
| <i>Figura 32.</i> Resultados del proceso (CS 6% en AA70 + PVA 10%) | 70 |
| <i>Figura 33.</i> Resultados del proceso (CS 8% en AA 70% + PVA 10%) | 71 |
| <i>Figura 34.</i> Resultados del proceso (CS 10% en AA 70% + PVA 10%) | 72 |
| <i>Figura 35.</i> Membrana correspondiente a una solución de CS 2% w/v en AA 70% v/v + PVA 10% w/v | 74 |
| <i>Figura 36.</i> Gráfica: Caudal vs Campo eléctrico | 75 |
| <i>Figura 37.</i> Muestra de solución lista para ensayar | 79 |
| <i>Figura 38.</i> Grafica correspondiente a solución de CS 2% w/v en AA 1% w/v..... | 81 |
| <i>Figura 39.</i> Comportamientos característicos de los fluidos no newtonianos | 81 |
| <i>Figura 40.</i> Grafica correspondiente a solución de CS 2% w/v en AA 70% w/v..... | 82 |
| <i>Figura 41.</i> Grafica correspondiente a solución de PVA 10% w/v..... | 82 |
| <i>Figura 42.</i> Gráficas esfuerzo de corte vs tasa de cizallamiento (azul) y viscosidad vs tasa de cizallamiento (rojo) de: a) CS 2% w/v, b) CS 4% w/v y c) CS 6% w/v..... | 83 |
| <i>Figura 43.</i> Grafica comparativa entre soluciones de quitosano con variación de concentración de ácido acético. | 84 |
| <i>Figura 44.</i> Grafica comparativa entre soluciones de quitosano con variación de concentración de ácido acético y solución de PVA..... | 85 |
| <i>Figura 45.</i> Grafica comparativa entre soluciones de CS 2% w/v, CS 4% w/v y CS 6% w/v (todas mezcladas con PVA 10% w/v 1:1)..... | 86 |
| <i>Figura 46.</i> Solución no homogénea de CS en AA + PVA + SD | 87 |
| <i>Figura 47.</i> Solución homogénea de CS en AA + PVA + SD | 88 |
| <i>Figura 48.</i> Soluciones de CS en AA + PVA + SD a electrohilar..... | 89 |
| <i>Figura 49.</i> Soluciones de CS en AA + PVA + SD a electrohilar (segunda fase)..... | 90 |
| <i>Figura 50.</i> Membrana recolectada de solución de (CS 2% w/v en AA 70% v/v + PVA 10% w/v) + SD 40% v/v (3:1)..... | 90 |
| <i>Figura 51.</i> Resultados del proceso [(CS 2% en AA 70% + PVA 10%) + SD 40%, 3:1]. | 91 |

RESUMEN

El presente trabajo de investigación consiste en la obtención de membranas fibrosas submicrométricas, mediante la técnica de electrohilado. Este proceso se basa en la inyección de una solución polimérica en un campo eléctrico, lo cual permite obtener fibras utilizables en varias aplicaciones (biomédicas, textiles, alimenticias, etc.). El biopolímero utilizado, es el quitosano, mismo que posee un sin número de propiedades que lo hacen idóneo para reemplazar polímeros sintéticos. Se prepararon varias soluciones, ensayando diferentes concentraciones de quitosano (CS) (2% w/v - 10% w/v), utilizando como solvente ácido acético (AA) (1% v/v - 70% v/v). A la solución CS/AA se le adicionó una solución polimérica de polivinil alcohol (PVA) (4% w/v - 10% w/v) para incrementar la electrohilabilidad. En el proceso de electrohilado se variaron los parámetros de trabajo: caudal (0.1 ml/h - 0.5 ml/h) y voltaje (6 kV - 21.3 kV), para encontrar la combinación ideal que proporcione resultados favorables. Tras realizar los ensayos se obtuvieron los mejores resultados morfológicos en las fibras de la solución: CS 2% w/v en AA 70% v/v + PVA 10% w/v, con un diámetro promedio de 220 ± 45 nm, utilizando 0.35 ml/h de caudal y voltajes desde 6 kV - 10 kV, mientras que en los ensayos reológicos a una tasa de cizallamiento de 300 s^{-1} , las viscosidades de las soluciones de CS 2% w/v, CS 4% w/v y CS 6% w/v, fueron: 430 mPa·s, 1190 mPa·s y 1800 mPa·s respectivamente, obteniendo mayor inestabilidad en el proceso de electrohilado, mientras aumenta la viscosidad.

PALABRAS CLAVE:

- **ELECTROHILADO**
- **QUITOSANO**
- **PVA**

ABSTRACT

The present research consists on the obtaining of submicrometric fibrous membranes, by means of the electrospinning technique. This process is based on the injection of a polymeric solution in an electric field, which makes it possible to obtain fibers that can be used in various applications (biomedical, textile, food, etc.). The biopolymer used is chitosan, which has a number of properties that make it suitable to replace synthetic polymers. Several solutions were prepared, testing different concentrations of chitosan (CS) (2% w/v - 10% w/v), using as solvent acetic acid (AA) (1% v/v - 70% v/v). To the CS/AA solution was added a polyvinyl alcohol (PVA) polymer solution (4% w/v - 10% w/v) to increase the electrospinnability. In the electrospinning process, the working parameters were varied: flow (0.1 ml/h - 0.5 ml/h) and voltage (6 kV - 21.3 kV), to find the ideal combination that provides favorable results. After carrying out the tests, the best morphological results were obtained in the fibers of the solution: CS 2% w/v in AA 70% v/v + PVA 10% w/v, with an average diameter of 220 ± 45 nm, using 0.35 ml/h of flow and voltages from 6 kV - 10 kV, while in the rheological tests at a shear rate of 300 s⁻¹, the viscosities of the solutions of CS 2% w/v, CS 4% w/v and CS 6% w/v, were: 430 mPa·s, 1190 mPa·s and 1800 mPa·s respectively, obtaining greater instability in the electrospinning process, while increasing the viscosity.

KEYWORDS:

- **ELECTROSPINNING**
- **CHITOSAN**
- **PVA**

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1. Introducción

Los polisacáridos son moléculas largas de hidratos de carbono, compuestas por monosacáridos unidos mediante enlaces glicosídicos, al ser carbohidratos contienen por tanto en su estructura, carbono, hidrógeno y oxígeno y su fórmula general es $C_x(H_2O)_y$. Los polisacáridos son además biopolímeros y para ser considerados como tal deben estar formados por más de diez monosacáridos (Harding, et al., 2017). La quitina es el segundo polisacárido de mayor producción en la naturaleza después de la celulosa y ambos cumplen funciones similares en los organismos que las contienen ya que se consideran polisacáridos estructurales, mientras la celulosa se encuentra en las paredes de las células de las plantas, la quitina es el componente principal del exoesqueleto, tendones y revestimiento de los sistemas respiratorio, digestivo y excretor de los artrópodos así como de la estructura externa de los insectos y ciertos hongos, también se encuentra en el material reflectivo de la piel y ojos de los artrópodos y cefalópodos (Herring, 1979). Estudios realizados estiman que la producción de quitina en la naturaleza, como subproducto, es de aproximadamente 10^{11} toneladas anualmente a nivel mundial, mientras que para uso industrial se estima una producción de quitina de 10 000 toneladas anuales (Kim S.-K. , 2011). Este polisacárido es una gran molécula compuesta de monómeros β -1,4-N-acetilglucosamina (GlcNAc), existen tres formas de quitina: α , β y γ . En la naturaleza, existen varias fuentes de las cuales se

puede obtener quitina, por nombrar algunas se tienen las siguientes familias: Hongos, Algas, Cnidarios (medusas), Asquelmintos (gusanos cilíndricos), Entoproctos, Briozoos (animales musgo), Foronídeos (gusanos de herradura), Braquiópodos (conchas de lámpara), Moluscos, Artrópodos, Pogonóforos, etc. (Muzzarelli R. , 1977). Las principales fuentes para la producción de quitina comercial son los desechos (exoesqueleto) de camarones, kril (crustáceo muy parecido al camarón), langostas y cangrejos. Mediante el procesamiento químico de este polisacárido se obtiene el biopolímero clave para la realización de esta investigación, el quitosano.

El quitosano es el principal y más importante derivado de la quitina y a diferencia de esta contiene bajas proporciones de grupos N-acetilo, además, los polímeros de quitosano son solubles en soluciones ácido – acuosas, mientras que la quitina es insoluble (Martin, 1995) . Este copolímero está compuesto de unidades N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina y puede ser obtenido de tres maneras: mediante desacetilación termoquímica de quitina en presencia de un medio alcalino, mediante hidrólisis enzimática en presencia de quitina desacetilizada o de forma natural, como parte de la estructura de ciertas especies de setas (Miranda & Lizárraga, 2012). El quitosano es producido comercialmente mediante la desacetilación de la quitina presente en el exoesqueleto (cascaras) de camarones y cangrejos, este proceso sin embargo resulta ser costoso y depende de la disponibilidad de la materia prima, que generalmente no se encuentra a lo largo de todo el año (por motivos de veda). Este biopolímero, posee diversas características y propiedades que resultan ser de suma importancia, por ejemplo: biocompatibilidad, biodegradabilidad, antimicrobiano,

analgésico, hemostático, floculante, fungistático, anticolesterómico, etc. gracias a sus propiedades es utilizado en varias industrias como la alimenticia, farmacéutica, cosmética, agrícola y biomédica, esta última es de gran interés y ha generado un sin número de investigaciones con el fin de utilizar el quitosano en diversas aplicaciones como la ingeniería de tejidos, regeneración de células óseas, cicatrización de heridas, tratamiento de quemaduras, entre otras. El quitosano ha sido estudiado ampliamente durante las últimas tres décadas principalmente para su uso en la industria alimenticia y cosmética, sin embargo gracias a sus propiedades físico-químicas, a partir del año 2004 se han realizado estudios sobre la factibilidad de utilizar este biopolímero para obtener fibras de escala submicrométrica mediante la técnica de electrohilado (Ohkawa K. et al., 2004). En el Ecuador existen varias investigaciones dedicadas a la extracción de este biopolímero a partir de algunas fuentes mencionadas anteriormente, como por ejemplo: camarón (Soro, 2007) (Lalaleo, 2010) (Luna, 2012) (Solano, 2017), cangrejo rojo (Pluas & Veliz, 2017), pluma de calamar (Estévez, Flores, & Novillo, 2013), entre otras y su aplicación principalmente para la industria alimenticia, sin embargo, no existe ninguna investigación sobre la utilización de quitosano para la obtención de membranas fibrosas submicrométricas. En este estudio se pretende determinar las concentraciones más idóneas de la solución de quitosano y los parámetros más favorables del proceso de electrohilado que permitan obtener fibras submicrométricas de manera repetible para estudios futuros en aplicaciones como filtración de agua y aire así como vendajes para la cicatrización de heridas.

1.2. Antecedentes

La Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, como parte del sistema de educación superior ha estado generando proyectos de investigación para el beneficio de la sociedad. Para ello se pretende desarrollar el procedimiento para la obtención y caracterización de fibras submicrométricas de quitosano, mediante la técnica de electrohilado.

El proceso para la obtención de quitina y quitosano ha sido ampliamente estudiado, y como se ha dicho anteriormente son obtenidos principalmente del procesamiento de subproductos de varios crustáceos como por ejemplo el camarón, cuyo caparazón constituye un desecho de la industria alimenticia y contiene en su composición altas proporciones de quitina. La quitina es extraída del exoesqueleto del camarón mediante una serie de procesos químicos que constituyen tres fases primordialmente: desmineralización, desproteización y decoloración. Posteriormente mediante un proceso químico denominado desacetilación, la quitina es transformada en quitosano. Dichos procedimientos han sido documentados y detallados por varios autores como es el caso de Mármol, et al. (2004) que en sus estudios implementan la desacetilación termoalcalina para la extracción de quitosano del exoesqueleto de camarón, al igual que Barra, Romero & Beltramino (2012). Por otra parte, existen estudios sobre la extracción de quitina y quitosano de especies de setas como el *Aspergillus Niger*, Balanta, Grande & Zuluaga (2010) en sus estudios extraen la quitina del micelio de este hongo que suele crecer en varios vegetales, de manera similar utilizan la desacetilación. El problema de la desacetilación es que resulta ser un procedimiento demasiado

agresivo y elimina los demás subproductos obtenibles de la quitina, como son el calcio, las proteínas y la Astaxantina (que es un caroteno muy valorado en el ámbito alimenticio) en el caso de los crustáceos, esto se debe al uso de sustancias corrosivas como el ácido clorhídrico (HCl) y el hidróxido de sodio (NaOH). Los subproductos obtenidos de este proceso resultan ser muy contaminantes, incluso más peligrosos que los propios desechos marinos de los cuales se pretende extraer los polímeros antes mencionados. En su tesis doctoral Pacheco (2010) propone por lo tanto un procedimiento biotecnológico que implica la utilización de bacterias lácticas y enzimas que permiten la obtención de quitosano sin eliminar los demás subproductos de la quitina y además disminuye el grado de despolimerización que sufre la misma al someterse a los ácidos necesarios en el proceso de desacetilación.

En cuanto a la obtención de nanofibras de quitina y quitosano, se han implementado varias técnicas en diversos estudios, por ejemplo Ifuku, et al. (2011) en su investigación sobre preparación y modificación química de nanofibras de quitina y quitosano, proponen la utilización de molinos para desintegrar los agregados de quitina y formar un gel que contiene nanofibras de aproximadamente 10 nm de diámetro, este procedimiento fue aplicado a caparazones de cangrejos y camarones además de cinco especies de hongos silvestres y a plumas de calamar, cada experimento mostro nanofibras de quitina muy similares. También se realizaron experimentos para la obtención de nanofibras de quitina, partiendo de quitina en polvo, diluyéndola en ácido acético y utilizando el mismo principio anterior e implementando un sistema de propulsión a chorro (*waterjet*) que suministra la preparación por una boquilla de

diámetro pequeño a alta presión, lo cual facilita la nanofibrilación. En cuanto a la producción de nanofibras de quitosano, los autores utilizaron el mismo procedimiento explicado anteriormente, partiendo de quitosano en polvo, se advierte que la obtención de nanofibras de quitosano mediante el proceso de electrohilado resulta difícil debido a la alta tensión superficial que posee la solución de este biopolímero. Adicionalmente Ifuku et al. proponen la modificación de las propiedades superficiales de nanofibras de quitina y quitosano mediante la aplicación de varios compuestos como: acetil DS, anhídrido ftálico, naftálico y maleico, N-halaminas, etc. Por su parte Wang, et al. (2014) en su investigación, proponen la obtención de nanofibras de quitosano en dilución con óxido de polietileno (PEO) y nitrato de plata (AgNO_3), mediante el proceso de electrohilado, con el fin de crear vendajes antibacterianos para acelerar la sanación de heridas profundas y heridas ocasionadas por quemaduras. Aseguran además que el quitosano, por sí solo, no se puede utilizar para la fabricación de micro o nanofibras, por el método de electrohilado debido a su baja solubilidad, de manera que requiere de otros compuestos que faciliten la fibrilación del quitosano, los más utilizados son: ácido trifluoroacético (TFA), 1,1,1,3,3,3 – hexafluoro – 2 – propanol (HFIP) y solución acuosa de ácido acético al 90%, sin embargo este último es considerado como el mejor solvente para la fabricación de nanofibras de quitosano debido a que es de bajo costo y poco contaminante, a diferencia del TFA y el HFIP que además de ser solventes muy caros, son tóxicos y volátiles.

En la *Figura 1* se puede visualizar el resultado obtenido por Wang et al. (2014) en su investigación, las nanofibras de Ag – quitosano/PEO, tienen una apariencia cilíndrica sin enredaderas, con lo que se verifica la efectividad de los parámetros utilizados en el proceso de electrohilado.

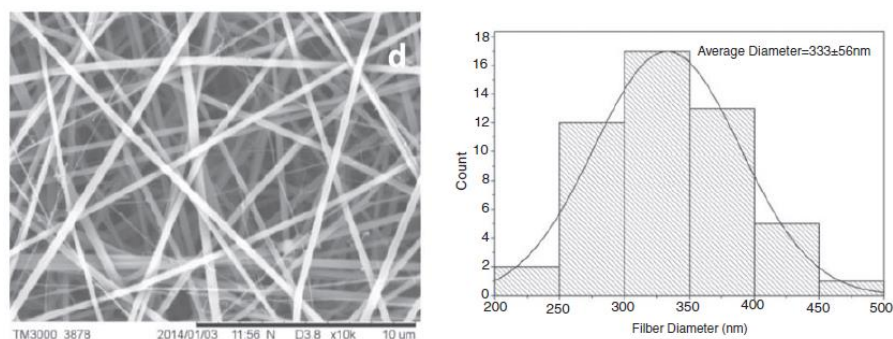


Figura 1. Nanofibras de Ag-quitosano/PEO con AgNO_3 al 8%
Fuente: (Wang et al., 2014)

En otra investigación Nirmala, et al. (2011) proponen la preparación y caracterización de nanofibras compuestas de poliamida-6/quitosano mediante el método de electrohilado para aplicaciones biomédicas, en este trabajo, los autores aprovechan las características de biocompatibilidad del quitosano y las excelentes propiedades mecánicas y físicas de la poliamida-6 para obtener nanofibras que puedan ser utilizadas en el cultivo de osteoblastos. La diferencia en esta investigación es que la base fija fue la poliamida-6, mientras que el quitosano se agregó en diferentes proporciones a la mezcla, además se utilizó como solvente, ácido fórmico. Tras su experimentación, los autores pudieron determinar que mientras mayor es la concentración de quitosano, el cultivo de osteoblastos se extiende de mejor manera en la matriz de nanofibras de poliamida-6/quitosano, además pudieron determinar que la

mezcla utilizada no tiene efectos tóxicos en el cultivo celular. En la *Figura 2* se puede apreciar el crecimiento de osteoblastos en la matriz de nanofibras de poliamida-6/quitosano.

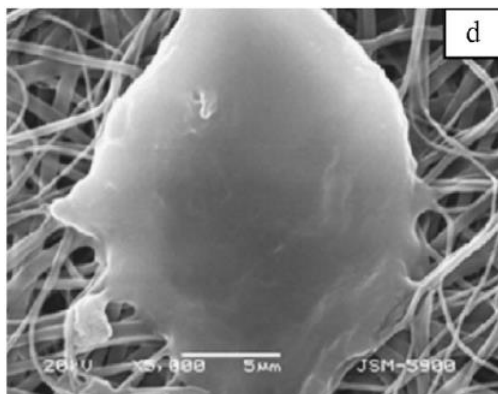


Figura 2. Crecimiento celular en las nanofibras de poliamida-6/quitosano con una concentración de quitosano al 2%.

Fuente: (Nirmala et al., 2011)

Como estas, muchas otras investigaciones se han realizado a nivel mundial en cuanto a la utilización del quitosano como biopolímero base o coadyuvante para la obtención de fibras submicrométricas que serán luego implementadas en diversas aplicaciones, siendo las más interesantes aquellas destinadas al área de la biomedicina. Pero como se dijo anteriormente, en el país no existen investigaciones de tal naturaleza, sin embargo la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, ha sido pionera en la investigación e implementación de la técnica de electrohilado para la obtención de nanofibras y nanopartículas. Desde el año 2016 se han realizado varias investigaciones en este campo, por ejemplo, en su tesis de pregrado Aules & Quijije (2016) desarrollaron un estudio en el cual obtienen y caracterizan fibras submicrométricas de fibroína de seda utilizando como solventes PEO y sangre de

Drago, como resultado de sus experimentaciones se tienen fibras con diámetros entre 2100 – 2300 nm, posteriormente estos estudios serían retomados por Melo (2018) quien en su tesis caracterizó fibras submicrométricas de fibroína de seda procedentes del capullo del gusano de seda chino y ecuatoriano y usó de igual manera PEO y sangre de drago como solventes; como resultado de sus experimentaciones se tienen fibras de un diámetro mucho menor (139,43 - 160 nm y 144,1 - 145,4 nm) que las obtenidas por Aules & Quijije (2016), adicionalmente logró caracterizar mecánicamente a las fibras obteniendo módulos de Young de 279,9 y 107,1 MPa. Ambas investigaciones tienen la finalidad de servir como precursoras para el futuro desarrollo de vendajes y apósitos que sirvan para la regeneración de tejido dérmico afectado por heridas crónicas o quemaduras.

1.3. Definición del Proyecto

La técnica del electrohilado (*electrospinning*), ha sido estudiada desde hace varios años, las primeras investigaciones y patentes sobre la implementación de fuerzas electrostáticas para la generación de filamentos de polímeros, surge en 1900 de la mano de J. F. Gooley, seguidamente Anton Formhals patenta varios aparatos desde 1934 hasta 1944 (Li & Wang, 2013). Posteriormente, en 1971, Baumgarten hizo un aparato para electrohilar fibras acrílicas con diámetros en el rango de 0.05 – 1.1 micras. Este aparato consta de un tubo capilar de acero inoxidable que está conectado a una bomba de desplazamiento positivo, una fuente de alto voltaje (DC) que se conecta al

capilar y una pantalla de metal colectora conectada a tierra (Huang et al., 2003), tal como se observa en la *Figura 3*.

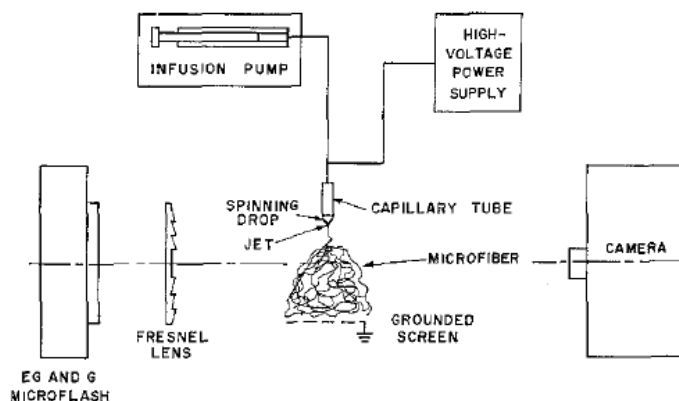


Figura 3. Aparato experimental utilizado por Baumgarten
Fuente: (Baumgarten, 1971)

Desde 1980 y especialmente en los últimos años el proceso de electrohilado (esencialmente similar al descrito por Baumgarten) ha recuperado más atención probablemente debido en parte a un creciente interés en la nanotecnología ya que mediante este proceso se pueden obtener fácilmente fibras ultra finas o estructuras fibrosas de varios polímeros con diámetros que van desde las micras hasta los nanómetros. En el proceso de electrohilado, se aplica un alto voltaje a una solución polimérica de manera que se inducen cargas dentro del fluido. Cuando las cargas dentro del fluido alcanzan un punto crítico, un chorro (*jet*) es expulsado desde la gota que se forma en la punta del capilar (o aguja), dando como resultado la formación del cono de Taylor. El jet viajará hacia la región de menor potencial, que en la mayoría de los casos, es un colector conectado a tierra (Ramakrishna et al., 2005). Hay muchos parámetros que influirán en la morfología de las fibras resultantes, por tal motivo, el

proceso de electrohilado consiste en comprender la electrostática, la reología de fluidos y las propiedades de la solución polimérica, como la velocidad de evaporación del disolvente, la tensión superficial y la conductividad de la solución. Estas propiedades fundamentales interactúan constantemente e influyen entre sí durante el proceso de electrohilado.

Luego de exponer algunas generalidades sobre el proceso de electrohilado, el cual será utilizado en la ejecución de la presente investigación, se conocerá un poco acerca de los materiales con los cuales se va a trabajar, tal es el caso del quitosano, que como se explicó anteriormente es un biopolímero que resulta ser insoluble en agua, por lo cual deberá utilizarse un medio ácido – acuoso para su correcta dilución. En esta investigación se ha decidido utilizar como solvente para el polvo y hojuelas de quitosano, ácido acético que es un ácido débil que no tiene repercusiones negativas de gran magnitud en las propiedades del biopolímero, se ensayarán varias soluciones a diferentes concentraciones hasta obtener la adecuada. Posteriormente se mezclará la solución de ácido acético y quitosano con una solución acuosa de PVA (poli vinil alcohol) (que de igual manera se realizará a diferentes concentraciones) polímero biocompatible que favorece la fibrilación del quitosano. La solución resultante será sometida al proceso de electrohilado, en el mismo se variarán los diferentes parámetros como caudal, voltaje, y distancia del colector al capilar, de tal manera que se logre identificar los parámetros óptimos de funcionamiento para obtener fibras homogéneas, sin defectos y sobre todo que sean repetibles.

Finalmente se realizará la caracterización morfológica de las fibras obtenidas, así como la caracterización reológica de las soluciones utilizadas.

1.4. Objetivos

1.4.1. *Objetivo General*

Obtener y caracterizar fibras submicrométricas de quitosano mediante la técnica de electrohilado.

1.4.2. *Objetivos Específicos*

- Definir los parámetros óptimos, tanto de la solución polimérica como del proceso de electrohilado, para obtener resultados repetibles.
- Caracterizar morfológicamente las fibras obtenidas mediante el proceso de electrohilado
- Caracterizar reológicamente las soluciones utilizadas para el proceso de electrohilado
- Comparar los resultados morfológicos obtenidos, utilizando soluciones con diferentes concentraciones de quitosano.

1.5. Justificación e Importancia

La razón por la cual cualquier investigación sobre quitosano es importante, es la disponibilidad de materia prima que posee el Ecuador. El camarón blanco es el segundo producto (no petrolero) de mayor exportación, anualmente el país oferta (en la actualidad) aproximadamente entre 600 a 800 millones de libras de este producto (CNA, 2018) (Ministerio de Comercio Exterior e Inversiones, 2017) que es comercializado mayoritariamente entero (es decir con exoesqueleto, 62%). La producción nacional de camarón es en su mayoría destinada a la exportación y representa el 87%, el 13% restante está destinado al mercado local (FLACSO-MIPRO, 2011). En el país, el exoesqueleto del camarón es considerado como desecho en la mayor parte de la industria alimenticia. El exoesqueleto, representa aproximadamente el 15% al 20% del peso total del camarón, sin embargo, los desechos del procesamiento del camarón, son de aproximadamente el 40 al 50% de su peso (esto incluye el exoesqueleto, patas, cabeza y cola) (Ramyadevi, Subathira, & Saravanan, 2012), esto quiere decir que anualmente se desperdician, como mínimo, un total de 41 000 toneladas de desechos de camarón, mismas que podrían ser utilizadas en la producción de quitosano. Según Mathur & Narang (1990) se necesitan aproximadamente 10 kg de desechos de camarón para obtener (mediante desacetilación química) 1 kg de quitosano, es decir que el país podría producir anualmente un total de 4100 toneladas de este biopolímero. Para tener una idea del rédito económico que esto generaría, el precio de 250 g de quitosano es de 231 USD (Sigma Aldrich), esto representaría un ingreso neto aproximado (eliminando costos de producción y materia prima) de 1500 millones de dólares. Es por

esto que en el país se deben realizar investigaciones sobre la extracción y producción a escala industrial de quitosano, así como su aprovechamiento para la fabricación de productos terminados como filtros y apósitos que utilizan la técnica del electrohilado para la generación de membranas nanofibras. El proceso de electrohilado ha adquirido mayor atención por parte de la comunidad científica en las últimas tres décadas, debido a sus ventajas únicas que generan resultados promisorios especialmente en el campo de la nanotecnología y biomedicina, en la *Figura 4*, se puede evidenciar el número creciente de publicaciones científicas que contienen la palabra *electrospinning* en su título, siendo Estados Unidos el principal país que lidera las investigaciones sobre electrohilado, seguido de Corea y Alemania (Huang et al., 2003).

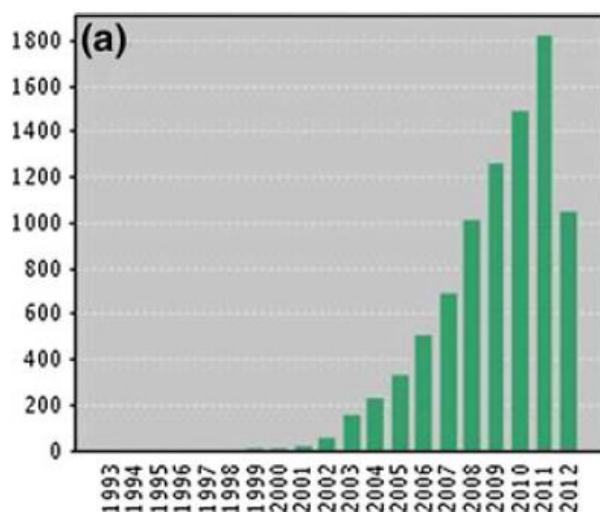


Figura 4. Número de publicaciones científicas con la palabra “electrospinning” o “electrospun”

Fuente: (Li & Wang, 2013)

Sin embargo en el Ecuador existen muy pocas investigaciones en cuanto al electrohilado, siendo la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, la única institución educativa que realiza investigaciones en esta área, con un total de 6 desde el año 2016. Esto demuestra la factibilidad, viabilidad e importancia de esta investigación, pues se cimentarían las bases para futuras investigaciones que se destinen a aplicar los resultados de este estudio, en campos como la filtración de agua y aire, y la formación de apósitos (*wound dressing*). Además se expone la necesidad emergente de estudiar e industrializar los métodos de extracción de quitosano a partir del exoesqueleto del camarón, con el fin de comercializar esta materia prima y facilitar los estudios de la misma.

1.6. Alcance

El actual proyecto de investigación tiene como alcance la generación de fibras submicrométricas del biopolímero quitosano, en una solución de ácido acético y PVA (poli vinil alcohol) aplicando una tecnología versátil como es el electrohilado, obteniendo mediante experimentación parámetros adecuados que permitan caracterizar a las fibras submicrométricas y conseguir así morfologías adecuadas. Con la investigación a realizar se logrará demostrar la capacidad para fabricar fibras submicrométricas, con una morfología adecuada y que posean todas las características benéficas propias del quitosano, para de esta manera en futuras investigaciones replicar su obtención utilizando otros polímeros sintéticos compatibles, sustancias propias de nuestro país que posean características especiales como la sangre de drago, que resulta ser un

excelente cicatrizante y antiséptico, con lo cual se podrá fabricar vendajes que aceleren el proceso de regeneración del tejido dérmico; nanopartículas que puedan reaccionar positivamente con las microfibras, como las nanopartículas de plata, que poseen excelentes propiedades utilizables en el área de filtración y purificación de aire; en fin se conseguirá una base sólida que permita el mejoramiento de varios productos aplicables en diversas áreas.

CAPÍTULO II

ESTADO DEL ARTE

2.1. Electrohilado

El electrohilado es una técnica conocida por más de 100 años, no obstante fue en 1934 cuando Formhals creó un proceso y un equipo, que mediante cargas eléctricas, permitía fabricar fibras sintéticas de pequeño diámetro (Sill & Von Recum, 2008). El electrohilado es utilizado mayormente en la fabricación de fibras, de un diámetro de escala nano y micrométrica, a partir de soluciones poliméricas cargadas en estado líquido en movimiento, inyectado, y el uso de una fuente eléctrica (Lee, Kim, & Kim, 2005). Este proceso se obtiene mediante el estiramiento coaxial de la solución, la misma que posee una propiedad de viscoelasticidad, ocasionado gracias a la formación de un campo eléctrico entre el plato colector y el fluido utilizado, esta fuerza aplicada debe ser lo suficientemente grande como para romper la tensión superficial en la solución cargada que se está utilizando, esto permite que se forme pequeños hilos dirigidos al colector (Duque et al., 2013). El electrohilado nos permite tener en el material flexibilidad, porosidad controlable, una superficie amplia por unidad de área con respecto al volumen de fluido inyectado, altos rendimientos y características mecánicas favorables, como son la rigidez y la resistencia a la tracción, para la fibra según su aplicación (Duque et al., 2013) (Huang et al., 2003) (García, 2013). En el proceso de electrohilado se tiene un elemento dominante, el cual es el alargamiento del fluido por la inestabilidad de la flexión, teniendo un adelgazamiento del mismo, mediante la

elongación, lo cual da lugar a la formación del cono de Taylor, como lo podemos ver en la *Figura 5* (Petrik & Maly, 2010)

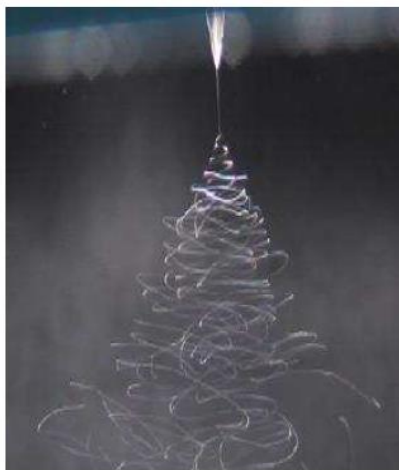


Figura 5. Electrohilado

Fuente: (Petrik & Maly, 2010)

La técnica del electrohilado nos permite realizar fibras con materiales sintéticos y naturales, es decir, una mezcla de materiales degradables y biodegradables, con el objetivo de tener características con propiedades biomédicas y mecánicas (Sill & Von Recum, 2008), estas fibras pueden ser destinadas a usos como filtración de agua y aire (Huang et al., 2003) (Gopal et al., 2006) (Tsai et al., 2001), en la industria textil, en ingeniería de tejidos, (García, 2013), en el área biomédica como vendas o apósitos, para tratar quemaduras, heridas en la piel e incluso hemorragias (Huang et al., 2003) (Jayakumar et al., 2011), hilos de sutura, injertos vasculares (García, 2013), fármacos, (Sill & Von Recum, 2008), entre otros, estos últimos utilizando polímeros biodegradables y biocompatibles como el PLA, el colágeno, el quitosano e incluso la gelatina, las aplicaciones las podemos ver en la *Figura 6*. (García, 2013) (Duque et al.,

2013) (Petrik & Maly, 2010). Además pueden ser utilizados en el área cosmetológica en mascarillas, gracias al tamaño de sus poros y a la gran superficie de la membrana (Huang et al., 2003).



Figura 6. Campos de aplicación de la tecnología de electrospinning (gama de productos ofertada por eSpin Technologies). a),b) y c) filtración molecular, de agua y aire, respectivamente; d) apósitos, vendas; e) textiles; f) biomedicina
Fuente: (García, 2013)

2.1.1. Parámetros

Existen parámetros que se deben considerar para que el proceso de electrohilado sea el adecuado, entre ellos se tienen parámetros de la solución o del proceso (Huang et al. 2003). Se debe controlar los parámetros de la solución debido a que si se tiene una concentración relativamente elevada se puede tener una mayor viscosidad y por lo tanto un aumento del diámetro de la fibra (Sill & Von Recum, 2008) (Megelski et al., 2002), estos parámetros lo podemos visualizar en la *Tabla 1*, por otro lado, se debe controlar los parámetros del proceso ya que si tenemos mayor voltaje, y la viscosidad de la solución no es elevada, no se tendrá un proceso continuo, lo que aumenta los defectos de la fibra (Deitzel et al., 2001), si se aumenta la tasa de flujo, se tendrá un aumento del diámetro de la fibra, al igual que el tamaño del poro (Sill & Von Recum, 2008) (Megelski et al., 2002), esto lo podemos visualizar en la *Tabla 2*.

Tabla 1.*Propiedades de la solución e influencia en el proceso de electrohilado*

| Parámetro | Condición | Efectos | Referencia |
|------------------------------|-----------|---|---|
| Concentración Polímero | ++ | La fibra no se forma porque la viscosidad es muy alta Se tiene menor control del flujo | (Sill & Von Recum, 2008) |
| | + | Mayor viscosidad Se empieza a formar la fibra Aumenta el diámetro de la fibra | (Sill & Von Recum, 2008) (Megelski, Stephens, Chase, & Rabolt, 2002) |
| | - | Menor viscosidad La solución se dividirá en gotitas debido a la tensión superficial Aparición de perlas | (Sill & Von Recum, 2008), (Megelski et al., 2002) |
| Volatilidad del solvente | + | Aumento de la densidad de poros Aumento del área de la superficie de la fibra | (Megelski et al., 2002) |
| | - | Disminución de densidad de poros. Formación de fibras más lisas | (Megelski et al., 2002) (Sill & Von Recum, 2008) |
| Conductividad de la solución | + | El proceso es más inestable cuanto más conductora sea la solución. El diámetro de la fibra es más pequeño | (Sill & Von Recum, 2008) |
| | - | La producción de fibras es más estable. Va aumentando el diámetro de la fibra. | (Sill & Von Recum, 2008) |

Tabla 2.
Variables de control del proceso de electrohilado

| Parámetro | Condición | Efectos | Referencia |
|------------------------------------|-----------|---|--|
| Voltaje | + | Si la velocidad de inyección no es lo suficientemente alta, la forma del cono no se mantendrá, y el cono se formara en la punta del capilar, aumentando los defectos en la fibra. El diámetro de la fibra aumenta | (Deitzel et al., 2001) |
| | - | Se va formando el cono sobre una gota colgante, entre más bajo sea hay peligro de goteo | (Sill & Von Recum, 2008) |
| Caudal | + | Diámetro de las fibras aumenta, al igual que el tamaño del poro. Si la tasa es relativamente elevada empieza a aparecer perlas y la fibra húmeda | (Sill & Von Recum, 2008) (Megelski et al., 2002) |
| | - | Fibra sin perlas y secas. Cuanto más pequeña sea la velocidad se necesita más tiempo de recolección | (Megelski et al., 2002) |
| Distancia entre colector y capilar | + | El diámetro de la fibra disminuye | (Doshi & Reneker, 1995) |
| | - | El diámetro de la fibra aumenta debido a que se concentra mayor material Se puede formar perlas en la fibra | (Doshi & Reneker, 1995) (Sill & Von Recum, 2008) |

2.2. Quitosano

Cuando el grado de acetilación (mismo que se define como el número promedio de unidades N-acetil-D-glucosamina por cada 100 monómeros de la cadena polimérica de la quitina expresado como porcentaje) es menor al 50%, la quitina se vuelve soluble en

medios ácidos – acuosos y toma el nombre de quitosano (Pillai, Paul, & Sharma, 2009). El quitosano es un copolímero lineal, resultante de la desacetilación alcalina de la quitina, es una sustancia fibrosa, formada principalmente por unidades repetitivas de β -(1,4) 2-amino, 2-desoxi, β -D-glucopiranososa (Maragatham, Panneerselvam, & Subbu, 2016) o su abreviación, D-glucosamina (GlcN), sin embargo la desacetilación no se logra completamente, esto quiere decir que existen unidades N-acetilglucosamina (GlcNAc) dispuestas aleatoriamente a lo largo de la cadena polimérica. En la *Figura 7*, se puede observar la estructura química tanto de la quitina como del quitosano.

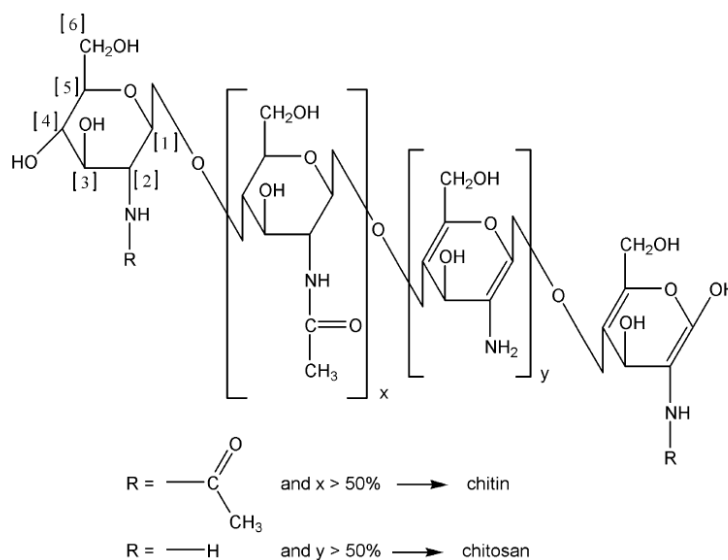


Figura 7. Estructura química de la quitina y el quitosano

Fuente: (Pillai et al., 2009)

De la imagen anterior se puede concluir que tanto la quitina como el quitosano comparten la misma estructura química, la diferencia radica en el número de unidades N- acetilglucosamina o D-glucosamina que posean sus respectivas cadenas poliméricas, si el contenido de unidades (GlcNAc) es mayor al 50% se tiene entonces

quitina, caso contrario si el número de unidades (GlcN) es mayor al 50% se tiene entonces quitosano. El quitosano fue descubierto por primera vez por Rouget en 1859 cuando hirvió la quitina en una solución concentrada de hidróxido de potasio, lo que resulto en su desacetilación (Muzzarelli R. , 1977). Casi un siglo después Rigby (1934) obtuvo dos patentes, una para producir quitosano a partir de quitina y otra para producir películas y fibras a partir de quitosano. Además, el quitosano es el único polímero catiónico pseudonatural y, por lo tanto, encuentra muchas aplicaciones que se derivan de su carácter único (floculantes para la recuperación de proteínas, descontaminación, etc.) (Rinaudo, 2006). La principal fuente de obtención de quitosano (comercial), es mediante la desacetilación de la quitina, misma que es extraída del exoesqueleto de cangrejos, camarones y langostas que en seco contienen aproximadamente 15-20% de quitina (Mathur & Narang, 1990). Sin embargo la obtención de quitosano de esta fuente, tiene una serie de inconvenientes, los más importantes quizá son: el costo/dificultad del proceso y la variabilidad de las características físico – químicas del quitosano, debido a la contaminación de las proteínas e inconsistentes niveles de desacetilación (Rane & Hoover, 1992). Sin embargo, en otra investigación se afirma que la producción de quitosano a partir de conchas de crustáceos, es económicamente viable, especialmente si incluye la recuperación de carotenoides como la astaxantina (Dutta, Dutta, & Tripathi, 2004). El quitosano puede ser obtenido además del micelio y la pared celular de ciertos hongos (*Mucor*, *Phycomyces*, *Aspergillus*, etc.) (Rane & Hoover, 1993), éste tiene varias ventajas sobre el quitosano obtenido de los crustáceos, como el grado de acetilación, el peso molecular (1 a 12×10^4 Da) y la viscosidad. En la *Tabla 3* se

resumen las fuentes comerciales y no comerciales en las cuales se encuentra presente tanto la quitina como el quitosano.

Tabla 3.

Fuentes de Quitina y Quitosano

| Artrópodos (invertebrados) | | |
|-----------------------------------|-----------------|--------------------------|
| Animales marinos | Insectos | Microorganismos |
| Anélidos | Escorpiones | Alga verde |
| Moluscos | Arañas | Levadura (tipo β) |
| Celentéreos | Hormigas | Hongos (pared celular) |
| Braquiópodos | Cucarachas | Hongos (micelio) |
| Crustáceos | Escarabajos | Alga café |
| Langostas | | Esporas |
| Cangrejos | | Chytridiales |
| Camarones | | Blastocladiales |
| Gambas | | |
| Kril | | |

Fuente: (Mathur & Narang, 1990)

Previo al proceso de desacetilación, la quitina pasa por dos fases, la desmineralización y la desproteización, una tercera fase conocida como descoloración o blanqueo, es opcional, y se realiza únicamente cuando se desea tener un producto completamente puro, ya que el pigmento no influye en las propiedades físico – químicas del polímero (Pacheco, 2010). La desacetilación química es el método industrial más extendido para la fabricación de quitosano y esta puede ser heterogénea (Tsaih & Chen, 2003) u homogénea (Nemtsev et al., 2002), sin embargo, se han desarrollado

métodos que excluyen la utilización de químicos tan agresivos, como el ácido clorhídrico (HCl) o el hidróxido de sodio (NaOH), que influyen en la degradación del polímero y que además producen residuos tóxicos y difíciles de procesar después de su utilización, tal es el caso del método biológico, que propone la utilización de enzimas y microorganismos para la extracción de quitina. Dos procesos son los más conocidos, el uso de enzimas proteolíticas para digerir las proteínas y un proceso de fermentación usando microorganismos que permiten la digestión de proteínas y minerales (Arbia et al., 2013).

Las propiedades físico – químicas del quitosano son variadas, y dependen en su gran mayoría del proceso mediante el cual fue obtenido. Cuando el quitosano se encuentra en su forma líquida, tiene un color que puede variar entre amarillo claro y amarillo pálido, además posee un fuerte olor a vinagre. El quitosano es un polímero lineal que posee un amplio espectro de pesos moleculares (densidad de la cadena polimérica), estos se pueden dividir en dos: quitosano de baja densidad (LDC) y quitosano de alta densidad (HDC), mismos que dependen directamente del grado de desacetilación y de la fuente que se haya extraído el quitosano, según Onsoyen & Skaugrud (1990) el peso molecular del quitosano disponible comercialmente varía entre 10000 y 1000000 de Daltons. En cuanto a la viscosidad de una solución de quitosano, tal es el caso de la temperatura, peso molecular, grado de desacetilación, concentración, pH y método de extracción. En cuanto a la temperatura, mientras esta aumenta, la viscosidad del quitosano disminuye, mientras que en el caso de la concentración pasa lo opuesto, al aumentar la concentración de quitosano, la

viscosidad también incrementa, de manera exponencial (Onsoyen & Skaugrud, 1990). El grado de desacetilación (relación entre las unidades de glucosamina y N-acetilglucosamina), es una propiedad extremadamente importante del quitosano, ya que influye en casi todas las otras propiedades de este biopolímero. Comercialmente, el grado apropiado de desacetilación de quitosano debe ser del 75 al 98% para fines biomédicos. A mayor grado de desacetilación, mayor es la pureza del quitosano (Annu et al. 2017).

El quitosano es soluble generalmente en algunos ácidos orgánicos e inorgánicos que poseen pH inferior a 6, que al mezclarse, forman un fluido no Newtoniano de cizallamiento delgado. Algunos de los ácidos orgánicos más utilizados son: ácido metanoico, ácido acético, ácido láctico, etc. mientras que los ácidos inorgánicos son: ácido clorhídrico, ácido nítrico diluido, ácido perclórico, etc. exceptuando el ácido sulfúrico y el ácido fosfórico, porque los iones sulfato y fosforo tienden a formar complejos insolubles con el quitosano, salvo que se aplique altas temperaturas (95 a 121°C). Además, el quitosano es insoluble en agua y bases acuosas, esto se debe al hecho de que el grupo $-NH_2$ de quitosano no puede protonarse en un medio básico o neutro, pero a un pH bajo debido a la repulsión electrostática, el grupo $-NH_2$ libre se protona y por lo tanto es soluble (Annu et al. 2017). Teóricamente, cuando el grado de desacetilación se aproxima al 50%, el compuesto se vuelve soluble en todos los niveles de pH, pero en la práctica, el grado de desacetilación necesario para obtener un producto soluble debe ser del 80 al 85% o más (Li & Kegley, 2004). El quitosano tiene grupos funcionales $-NH_2$ y $-OH$ como sitios reactivos de su cadena principal. La mayoría

de estos grupos funcionales, especialmente, los grupos amino, están protonados, lo que da lugar a que el quitosano sea más reactivo. Mientras existan más grupos $-NH_2$ protonados disponibles en la cadena polimérica, mayor será su reactividad y, por lo tanto, su capacidad para unirse con iones metálicos tóxicos y también formar quelatos con iones de metales de transición. Esta capacidad quelante del quitosano ejemplifica su importancia en el tratamiento del agua y la purificación del aire (Annu et al. 2017). En la *Tabla 4*, se resumen algunas de las propiedades antes mencionadas (de la quitina y el quitosano), y sus valores más usuales encontrados comercialmente.

Tabla 4.

Algunas propiedades físico – químicas de la quitina y el quitosano

| Parámetro Característico | Quitina | Quitosano |
|--|---|---|
| Peso Molecular (Da) | 10 ⁶ (quitina natural) 1 – 5 x 10 ⁵ (producto comercial) | 1.5 x 10 ⁵ (producto comercial) |
| Grado de Polimerización (Número promedio de la unidad repetitiva en una molécula) | 600 – 1800 | 600 – 1800 |
| Composición empírica | C ₈ H ₁₃ O ₅ N | C ₆ H ₁₁ O ₄ N |
| Contenido de nitrógeno (%) | 6 – 7 | 7 – 9.5 |
| Porcentaje de humedad | 2 – 10 | 2 – 10 |
| Grado de desacetilación (%) | 10 | 60 – 90 |

CONTINÚA

| | | |
|---------------------------|-----------|------------|
| Viscosidad (Cps) | | |
| 1% en 1% de ácido acético | insoluble | 250 – 2500 |

Fuente: (Mathur & Narang, 1990)

Entre las propiedades que hacen del quitosano un polímero tan particular, se puede mencionar la biocompatibilidad ya que está compuesto de unidades monoméricas N-acetilglucosamina, mismas que se encuentran en el ácido hialurónico, una macromolécula extracelular que es importante en la reparación de heridas (Keong & Halim, 2009), (Suh & Matthew, 2000). Es además biodegradable lo que lo hace muy llamativo en aplicaciones de liberación de fármacos (Kean & Thanou, 2010), (Yang et al., 2007). El quitosano es un material biológicamente compatible y químicamente versátil, estas dos propiedades básicas han sido utilizadas ampliamente en aplicaciones como el suministro de fármacos y la ingeniería de tejidos para crear una gran cantidad de formulaciones y estructuras de soporte (*scaffolds*) que se muestran prometedores en el cuidado de la salud. El quitosano está aprobado para aplicaciones dietéticas en Japón, Italia y Finlandia (Illum, 1998) y ha sido aprobado por la FDA para su uso en apósitos para heridas (Wedmore et al., 2006) no obstante aún no está aprobado para ningún producto en el suministro de fármacos. En varios estudios se ha determinado que la toxicidad del quitosano, es dependiente del grado de desacetilación y del peso molecular. A mayor grado de desacetilación, la toxicidad está relacionada con el peso molecular y la concentración, mientras que a menor grado de desacetilación la toxicidad es menos pronunciada y esta menos relacionada con el peso molecular (Schipper, Varum, & Artursson, 1996). Aun así, la mayoría de quitosanos y sus derivados son

relativamente no tóxicos en comparación con polímeros tóxicos como la polietilenoimina (Kean & Thanou, 2012). El quitosano es conocido por sus propiedades antifúngicas y antibacterianas, que le permiten impedir la proliferación y crecimiento de una gran variedad de microorganismos, inclusive patógenos humanos (Rabea et al., 2003), posee un amplio espectro de inhibición contra bacterias Gram – positivas y Gram – negativas y tiene la capacidad de esterilizar algunas levaduras y mohos (Kong et al., 2008). Muchas aplicaciones prácticas relacionadas con la actividad antimicrobiana del quitosano se encuentran en diversas áreas tales como la industria alimenticia (conservación de alimentos), agricultura (protección de cultivos) e hidrología (tratamiento de aguas residuales) (Cunha et al., 2012). Algunas investigaciones, han arrojado resultados significativos sobre los efectos analgésicos de la quitina y el quitosano. Estos estudios se han llevado a cabo generalmente aplicando productos (apósitos) de quitosano y sus derivados en heridas abiertas, por ejemplo Allan et al. en 1984 descubrieron que el quitosano proporciona un efecto calmante y agradable al aplicarse en heridas abiertas, de igual forma Minami et al. en 1993, informaron que los animales utilizados en la investigación no sentían dolor cuando sus heridas eran cubiertas de quitosano. La bradiquinina es una de las principales sustancias relacionadas con el dolor y los niveles de esta sustancia disminuyen en presencia de quitina y quitosano (Okamoto et al., 2002). El quitosano posee además, otras características que son de gran interés en aplicaciones médicas, a continuación se enlistarán algunas de estas características.

- Habilidad de gelación.
- Capacidad quelante.
- Hemostasia.
- Actividad espermicida.
- Actividad anticancerígena.
- Antiinflamatorio.
- Capacidad de mucoadhesión.
- Capacidad de curación de heridas.
- Capacidad de regeneración ósea.
- Capacidad de liberación de fármacos.
- Capacidad inmunoadyuvante.
- Actividad antioxidante.
- Actividad antidiabética.
- Actividad Neuroprotectora.
- Actividad antitumoral.

El quitosano ha sido utilizado en varias áreas de la biomedicina, algunas de las aplicaciones son por ejemplo: piel artificial (Parvez et al. 2012), (Ravi Kumar, 2000), suturas quirúrgicas absorbibles (Mathur & Narang, 1990), tratamiento y regeneración del tejido óseo y cartilaginoso (Lu et al., 1999), agente hemostático (Okamoto et al., 2003), agente anticolesterémico (Muzzarelli & Muzzarelli, 2006), (Gallaher et al., 2000), (Maezaki et al., 1993) y liberación de fármacos (Kean & Thanou, 2011), (Janes, Calvo, & Alonso, 2001). En la industria alimenticia el quitosano se ha utilizado como

revestimiento de alimentos (Guilbert, Gontard, & Cuq, 1995) por ejemplo: frutas y vegetales (Jianglian & Shaoying, 2013), pan (Park et al., 2002), huevos (Bhale et al., 2003), etc. Además se ha implementado como aditivo de engorde en aves de corral (Zikakis, Saylor, & Austin, 1982). En la agricultura se ha usado como recubrimiento de semillas (Guan et al., 2009), (Zhou et al., 2002) y como recubrimiento de hojas, fertilizante, bioinsecticida, biopesticida y bionematicida. Debido a su naturaleza policatiónica, el quitosano puede usarse como agente floculante, también puede actuar como agente quelante y captor de metales pesados, lo que lo hace excelente en aplicaciones como: tratamiento de agua de procesamiento (Dutta et al. 2003), eliminación de petróleo y productos derivados del petróleo de las aguas residuales (Barros et al., 2014), además el quitosano es utilizado para la purificación de agua potable y para la remoción de tintes. En la manufactura de papel el quitosano ha sido utilizado debido a que proporciona mayor resistencia en seco y en húmedo, en la industria textil se utiliza debido a que aumenta la resistencia a los tintes, mejora la resistencia de la fibra e imparte una propiedad antiestática muy deseada a la fibra sintética (Mathur & Narang, 1990). Mientras que en la industria cosmética se usa en tres áreas específicas, cuidado del cabello, cuidado de la piel y cuidado bucal. (Dutta et al. 2003). En la *Tabla 5*, se exponen algunas de las aplicaciones más importantes del quitosano.

Tabla 5.*Principales aplicaciones del quitosano.*

| Áreas | Aplicaciones |
|-----------------------------------|---|
| Agricultura | <p>Mecanismo de defensa en plantas.</p> <p>Estimulación del crecimiento de la planta.</p> <p>Recubrimiento de semillas, protección contra heladas</p> <p>Liberación de fertilizantes y nutrientes en el suelo</p> |
| Tratamiento de agua | <p>Floculante para aclarar el agua (agua potable, agua en piscinas)</p> <p>Eliminación de iones metálicos</p> <p>Polímero ecológico (eliminar polímeros sintéticos)</p> <p>Reducir olores</p> |
| Comidas y bebidas | <p>Fibra dietética</p> <p>Enlazamiento de lípidos (reducir el colesterol)</p> <p>Preservativo</p> <p>Espesante y estabilizador para salsas</p> <p>Revestimiento protector, fungistático y antibacteriano para frutas</p> |
| Cosméticos y artículos de tocador | <p>Mantener la humedad de la piel</p> <p>Tratar el acné</p> <p>Mejora la flexibilidad del cabello</p> <p>Reducir la electricidad estática en el cabello</p> <p>Tono de piel</p> <p>Cuidado bucal (pasta de dientes, enjuague)</p> |
| Biofarmacéuticas | <p>Inmunológico, antitumoral</p> <p>Hemostáticos y anticoagulantes</p> <p>Curación de heridas, bacteriostático</p> |

Fuente: (Rinaudo, 2006)

2.3. Electrohilado de quitosano

La técnica de electrohilado o también llamado *electrospinning*, es de bajo costo, simple y efectiva para la obtención de micro y nanofibras poliméricas que poseen grandes áreas superficiales, propiedades mecánicas superiores y facilidad de funcionalización. Esto aunado a la posibilidad de producción a gran escala, hace del electrohilado una técnica muy atractiva para diferentes aplicaciones. Uno de los biopolímeros implementados en el proceso de electrohilado es el quitosano que cuando se encuentra disuelto, los enlaces de hidrogeno impulsan la formación de microfibrillas, dependiendo de la concentración de quitosano. Esto permite la exitosa formación de nanofibras electrohiladas de este biopolímero (Ohkawa K. et al., 2004). Varias investigaciones se han realizado en cuanto a la obtención de nanofibras electrohiladas de quitosano, sus derivados y compuestos. Por ejemplo, Ohkawa K. et al. en su investigación, por primera vez lograron obtener nanofibras, a partir de una solución de TFA (ácido trifluoroacético) y quitosano. Ohkawa K. et al. demostraron la dependencia de la concentración de quitosano y el solvente utilizado en la capacidad de formación de fibras. Afirman que al utilizar soluciones de ácido fórmico, ácido acético, ácido clorhídrico y ácido dicloroacético con quitosano, no se pudieron obtener fibras, solo tras mezclar la solución de quitosano y ácido fórmico con una solución de PVA, se pudo obtener nanofibras. A medida que se aumentaba la porción de PVA en la mezcla, defectos evidentes en las fibras como perlas (*beads*) fueron desapareciendo, cuando la solución alcanzó una relación de quitosano y PVA 50:50 se obtuvieron fibras uniformes de 120 nm. De igual manera, la solución de TFA y quitosano al 8% w/v, arrojó

nanofibras homogéneas de 490 nm de diámetro promedio. Ohkawa K. et al. expresan que el TFA es un buen solvente para la formación de fibras debido a que forma sales con los grupos amino del quitosano y debido a la alta volatilidad de TFA que es ventajosa para la solidificación rápida del chorro electrificado de la solución. En otra investigación, Jacobs et al. (2011), realizan la optimización de los parámetros tanto de la solución como del proceso de electrohilado utilizando un enfoque de diseño factorial para obtener nanofibras de quitosano uniformes. Los parámetros estudiados fueron la intensidad del campo eléctrico, la relación de disolventes (ácido trifluoroacético/diclorometano), la concentración de quitosano en la solución, sus efectos individuales y de interacción sobre el diámetro de las nanofibras. En este estudio Jacobs et al. llegan a la conclusión de que las interacciones entre la intensidad del campo eléctrico y la relación de solventes - TFA/DCM, así como entre la intensidad del campo eléctrico y la concentración de quitosano influyen de manera significativa en la obtención de fibras uniformes, los parámetros que arrojaron fibras uniformes con un diámetro de 176 nm fueron: intensidad del campo eléctrico 0.75 kV/cm, nivel de relación de solventes TFA/DCM 80/20% v/v y el nivel de concentración de quitosano 5.5% w/v. Por su parte Geng, Kwon & Jang (2005), en su investigación utilizan quitosano de distinto peso molecular (30000, 106000 y 398000 g/mol), como solvente usan ácido acético glacial y agua destilada. En sus experimentaciones, Geng et al. advierten que para poder obtener nanofibras de quitosano, la concentración de ácido acético acuosa debe ser superior al 30%, debido a que el ácido acético más concentrado en agua disminuye progresivamente la tensión superficial de la solución de quitosano y aumenta la densidad de carga eléctrica sin un efecto significativo sobre la viscosidad, aun así

cuando la concentración de ácido acético en la solución es mayor a 90% esta no disuelve suficiente quitosano para hacer una concentración viscosa electrohilable. Como resultado de los ensayos se puede verificar una disminución de la tensión superficial de la solución a medida que aumenta la concentración de ácido acético, de tal manera, para una solución de ácido acético al 10% la tensión superficial fue de 54.6 dyn/cm, mientras que para 90% fue de 31.5 dyn/cm. Geng et al. afirman que a medida que la concentración de ácido acético incrementa, menor es la aparición de beads en las fibras y mayor es su diámetro, también se demuestra la influencia de la concentración de quitosano y su peso molecular, para una solución de quitosano de 7% a 7.5% de concentración con peso molecular de 106000 g/mol las fibras producidas fueron continuas y uniformes, para la solución de quitosano de bajo peso molecular (30000 g/mol), con concentración de 9.5% a 10.5% las fibras contenían beads de gran tamaño y eran frágiles, mientras que las nanofibras de la solución de quitosano de mayor peso molecular con concentración de 2.5% a 3% mostraron superficies más ásperas y más finas con un poco de beads. En la *Figura 8* se puede observar la morfología de las fibras antes mencionadas. Geng et al. destacan además la influencia del campo eléctrico en la fibrilación de la solución, cuando el campo eléctrico tiene valores entre 3 a 4.5 kV/cm fibras uniformes y homogéneas son obtenidas. Cuando el campo eléctrico supera el valor de 4.5 kV/cm se obtienen fibras más delgadas con muchos defectos (beads), debido al incremento de la fuerza de elongación y a la inestabilidad del chorro, inducida por el campo eléctrico más fuerte. Los diámetros promedio de las nanofibras electrohiladas bajo campos eléctricos de 3 y 4 kV/cm fueron

de 180 y 130 nm, respectivamente, y la distribución del diámetro se hizo más estrecha con el aumento del campo eléctrico.

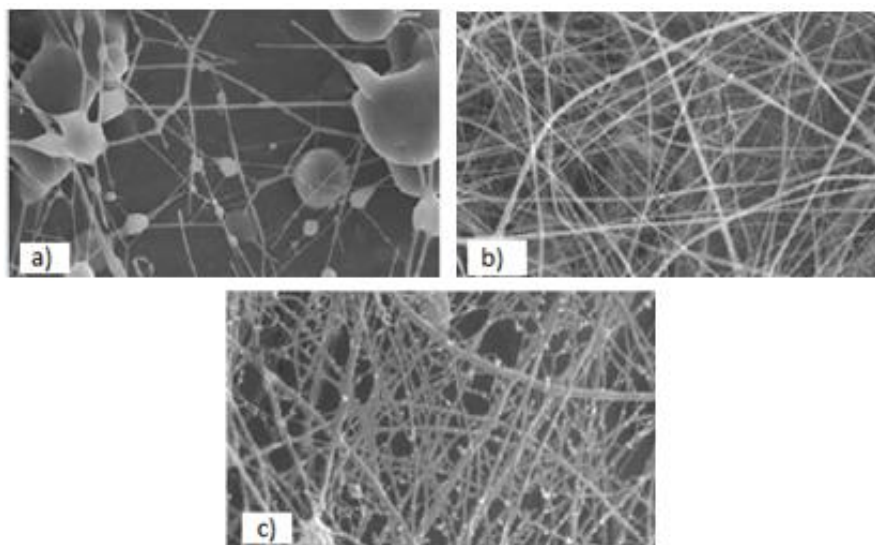


Figura 8. Microscopias de fibras electrohiladas de quitosano con diferentes pesos moleculares: a) 30000 g/mol, 10%; b) 106000 g/mol, 7% y c) 398000 g/mol, 2.5%.

Fuente: (Geng, Kwon & Jang, 2005)

En su investigación, Zhou, Yang, & Nie (2006), obtienen nanofibras de quitosano/PVA, utilizando como solvente ácido acrílico (AA), en este estudio se realiza un análisis de la influencia de la viscosidad y conductividad de las soluciones en la electrohilabilidad de las mismas. Ellos demuestran que la viscosidad de las soluciones incrementa mientras el contenido de quitosano en la relación CS/PVA disminuye, este comportamiento es similar para las concentraciones de 4% AA y 90% AA, sin embargo las viscosidades de las soluciones con 90% AA son menores que las de 4% AA. El comportamiento de la conductividad es diferente, para las soluciones con una concentración de 4% AA, la conductividad disminuye a medida que disminuye el contenido de quitosano en la relación CS/PVA, mientras que para las soluciones con

una concentración de 90% AA la conductividad aumenta a medida que disminuye el contenido de quitosano. Esto tiene una repercusión en la morfología de las fibras electrohiladas, para las soluciones con 4% AA, a medida que la concentración de quitosano disminuye en la relación CS/PVA, se pueden obtener fibras solo para relaciones menores de 80/20, ya que para relaciones mayores solo existe la presencia de beads, mientras que para las soluciones con 90% AA, se obtienen fibras en todas las relaciones de CS/PVA ensayadas, esto se puede evidenciar en las *Figuras 9 y 10*.

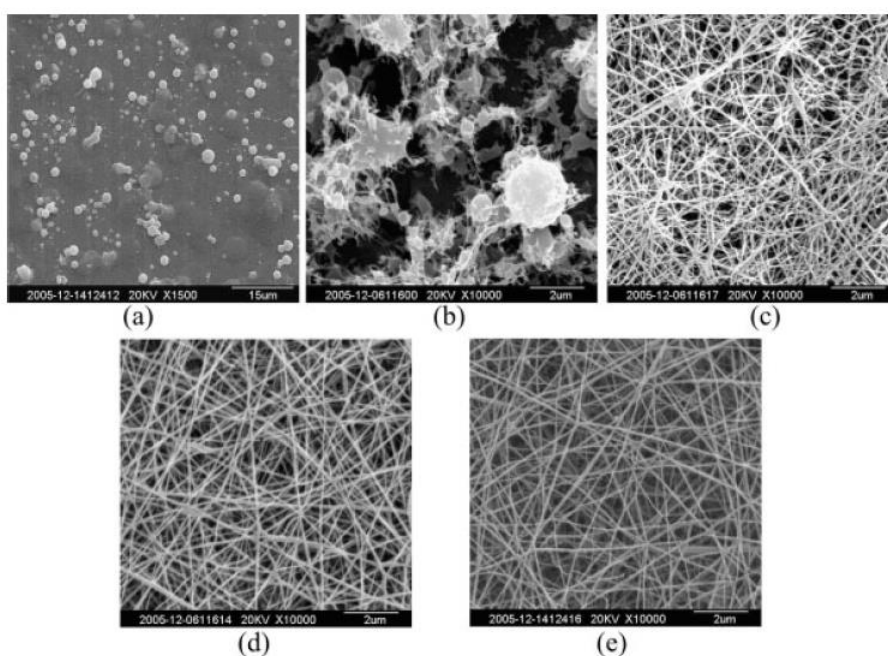


Figura 9. Fotografías SEM de nanofibras con diferentes relaciones de masa CS/PVA cuando la concentración de AA fue del 4%: (a) 90:10, (b) 80:20, (c) 70:30, (d) 60:40 y (e) 50:50. El voltaje de electrohilado fue de 29 kV.

Fuente: (Zhou, Yang & Nie, 2006)

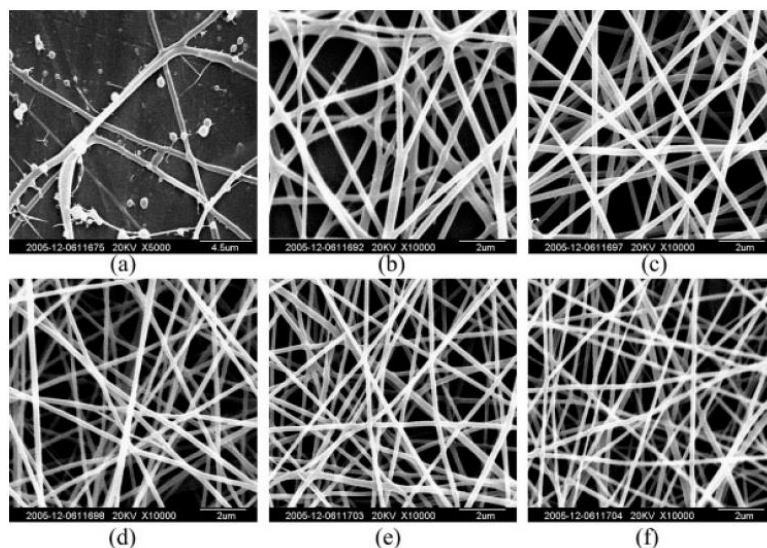


Figura 10. Fotografías SEM de nanofibras con diferentes relaciones de masa CS/PVA cuando la concentración de AA fue del 90%: (a) 95:5, (b) 90:10, (c) 80:20, (d) 70:30, (e) 60:40, y (f) 50: 50. El voltaje de electrohilado fue de 18 kV.

Fuente: (Zhou, Yang & Nie, 2006)

El diámetro de las fibras y su distribución, a medida que el contenido de CS en las mezclas disminuyó de 90/10 a 50/50, el diámetro promedio de las nanofibras disminuyó gradualmente de 291 a 170 nm y su distribución se hizo un poco más estrecha.

En cuanto a las aplicaciones de las nanofibras de quitosano, estas han visto su mayor explotación en el área de la biomedicina, particularmente en el área de la ingeniería de tejidos. Por ejemplo, en su investigación Bhattarai et al., (2005), obtuvieron membranas nanofibrosas de quitosano y PEO, para el estudio de su compatibilidad celular con osteoblastos y condrocitos. Los resultados obtenidos fueron positivos en cuanto al crecimiento celular tanto de los osteoblastos como de los condrocitos en una membrana de CS/PEO 90:10. Tanto la adherencia como el crecimiento celular se deben a la gran área superficial disponible en las nanofibras. En

otra investigación, se fabricaron *scaffolds* de quitosano, colágeno y poli (ácido L-láctico-Co- ϵ -caprolactona) (P (LLA-CL)), para su uso como injerto vascular. En este estudio el *scaffold* de colágeno/quitosano/P (LLA-CL) con la relación de 20:5:75 presentó las mejores propiedades mecánicas (resistencia a la tracción de 16.9 MPa, deformación en rotura de 112%, módulo elástico de 10.3 MPa) y la proliferación de células endoteliales aumentó significativamente (Yin et al., 2013). Como estas, otras investigaciones han sido realizadas en el área de la biomedicina, sin embargo no es la única aplicación que se puede dar a las nanofibras de quitosano. Varias investigaciones han sido realizadas para probar la eficiencia de las nanofibras de quitosano para la formación de membranas que sirvan como filtros, en el tratamiento de aguas residuales. Debido a su acción floculante y quelante el quitosano es un excelente captor de iones metálicos. En su investigación Horzum et al., (2010) demostraron que las nanofibras de quitosano pueden aplicarse en la eliminación continua de varios iones metálicos. El material de filtro de nanofibras a base de quitosano, respetuoso con el medio ambiente, tiene beneficios prominentes debido a la gran área de superficie por unidad de masa, que resulta del diámetro muy fino. Los resultados del estudio de sorción mostraron que el tiempo de agitación, la concentración de iones metálicos y la temperatura tienen una gran influencia en la sorción de Fe (III), Cu (II), Ag (I) y Cd (II) en la membrana de nanofibras de quitosano.

En esta investigación, se analizará también la morfología de las fibras que se obtengan del proceso de electrohilado de una solución de quitosano + PVA + Sangre de drago, esto debido a las propiedades que posee dicha sustancia, que aunadas a las

propiedades del quitosano, harán de la solución resultante un recurso muy interesante para estudios futuros, que permitan aprovechar las características de estas sustancias en aplicaciones biomédicas tales como apósitos y *tissue scaffolds*. Por tal motivo se va a conocer cierta información sobre la sangre de drago.

2.4. Sangre de drago

Sangre de drago o sangre de grado es un látex de color rojo sangre que se extrae de la corteza de especies vegetales tropicales como es el *Croton lechleri Mull* (Pereira et al., 2010) como podemos ver en la *Figura 11*. Este látex extraído es un fluido viscoso y de sabor astringente. Las especies tropicales que contienen sangre de drago se encuentran en el sur de México y en países de Sudamérica (Risco et al., 2003) como son Colombia, Perú, Bolivia, Brasil y Ecuador. El *Croton lechleri Mull* es un árbol que puede llegar a medir hasta 25 m de altura y se encuentran en lugares desde los 200 hasta los 1000 metros sobre el nivel del mar en bosques tropicales húmedos. (Risco et al., 2005)



Figura 11. Sangre de drago

Fuente: (Risco et al., 2005)

Las poblaciones indígenas han usado la sangre de drago debido a sus propiedades curativas, antivirales, antiinflamatorias y antitumorales. Siendo el componente conocido como taspina el responsable principal de que la sangre de drago tenga propiedades curativas de heridas y antiinflamatorias, mientras que la lignana solo ayuda a sus propiedades curativas (Desmarchelier et al., 1997). Existe un componente llamado porantocianidina con actividad antiviral (Risco et al., 2003), el cual se ha determinado que ayuda a la inhibición de diferentes virus como es la gripe, herpes y hepatitis, (Desmarchelier et al., 1997) se ha tratado de forma clínica las lesiones genitales y anales de herpes simple en personas con SIDA (Risco et al., 2003). La sangre de drago es usado como componente cicatrizante, por su capacidad de formar más rápido la costra de las heridas, regenerando la piel (Risco et al., 2005), es usado también como antiinflamatorio y analgésico, ya que ayuda a disminuir el dolor (Condo Curipallo, 2014), antiviral y antibacterial, ya que impide el ingreso de virus, como hepatitis, herpes y parainfluenza en las células (Condo Curipallo, 2014), en la amazonia se utiliza con gran frecuencia para poder curar el cáncer de huesos y la tuberculosis, incluso mezclado con otras plantas medicinales, se ha utilizado para tratar el cáncer y los tumores (Jones, 2003).

CAPITULO III

EXPERIMENTACIÓN

3.1. Materiales

Los materiales utilizados en esta investigación, serán listados a continuación.

3.1.1. Quitosano

Se adquirió quitosano en polvo de la marca Chemsavers (*Figura 12*), mismo que posee un grado de desacetilación (DD) superior al 90%, el polvo posee un color marrón claro, con contenido de humedad menor al 10% y su viscosidad en solución puede ir desde 50 hasta 800 mPa·s (dependiendo de la concentración de quitosano) y su densidad aparente es de 0.60 g/ml.



Figura 12. Quitosano en polvo.

3.1.2. Polivinil Alcohol (PVA)

Se adquirió PVA de la marca Lobachemie (*Figura 13*), este producto se encuentra en estado sólido a manera de gránulos incoloros, posee un peso molecular aproximado de 115 kDa, su grado de polimerización está en un rango de 1700 y 1800, y su viscosidad en solución varía entre 25 y 32 cP.



Figura 13. PVA en gránulos.

3.1.3. Ácido Acético Glacial (CH_3COOH)

El quitosano es soluble en ácidos orgánicos, para lo cual se ha conseguido como solvente, ácido acético glacial. Según la literatura, el quitosano es soluble en ácidos cuyo pH varía entre 0.6 y 2.8 (Romanazzi et al., 2009). Para esta investigación, se utilizó ácido acético glacial de la marca J. T. Baker (*Figura 14*), cuyo pH es de 2.4 (solución 1 M). Este solvente, posee un fuerte olor a vinagre, es corrosivo y debe ser manipulado con el equipo de protección personal adecuado (mascarilla, guantes y gafas).



Figura 14. Ácido acético glacial

3.1.4. Sangre de Drago

La sangre de drago se caracteriza principalmente por ser un producto orgánico certificado, adquirida en la Fundación Chankuap ubicada en la ciudad de Macas, Ecuador. La sangre de drago adquirida se presenta en la *Figura 15*.



Figura 15. Sangre de drago

Fuente: Fundación Chankuap

3.2. Equipos e instrumentos

Los equipos utilizados en la realización de esta investigación son:

- *Balanza electrónica Shimadzu (Unibloc) TW423L (Figura 16a)* posee una apreciación de 1 mg, un rango que va de 2 mg a 420 g, un error aproximado de 1mg y la posibilidad de entrada y salida digital de datos.
- *Placa de calentamiento y agitación BIPEE (Figura 16b)* con rango de agitación entre 0-2000 rad/min, calentamiento entre 0-400°C, un RTD-PT100 como sensor de temperatura con un error menor del 0.5%.

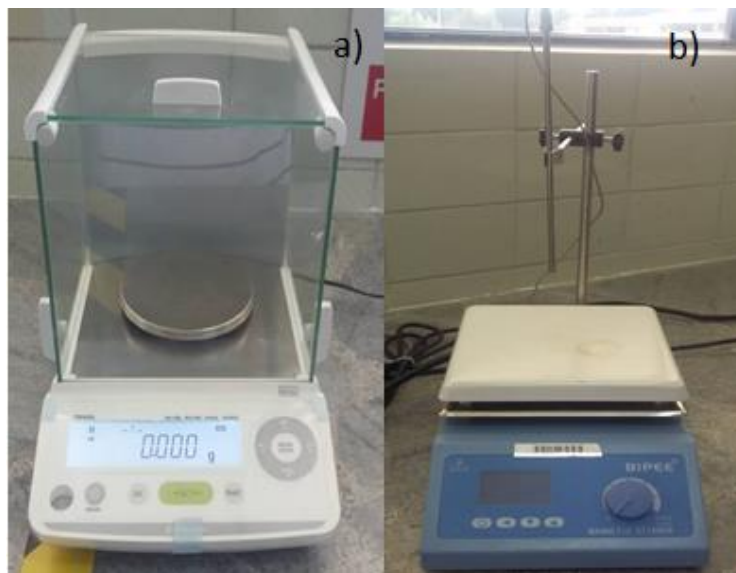


Figura 16. Equipos utilizados, a) balanza electrónica, b) placa de calentamiento y agitación.

3.3. Sistema de electrohilado

El equipo necesario para el proceso de electrohilado, se puede apreciar en la *Figura 17*. Se utilizó una configuración horizontal para la recolección de las fibras submicrométricas.



Figura 17. Sistema de electrohilado

La Bomba Cole Palmer (a) de modelo 788110C, posee una exactitud de $\pm 0.5\%$, con capacidad de jeringas de 0.5 μL , 10 mL, 60 mL, el caudal depende del tamaño de la jeringa, como se ve a continuación:

- 0.5 μL (mín. 1.6 pL/min)
- 10 mL (máx. 26.014 mL/min)
- 60 mL (máx. 80.404 mL/min)

La Fuente de alto voltaje Genvolt (b) de modelo 73030, posee una salida de voltaje de 0-30 kV, máxima salida de corriente de 1mA, y salida de poder de 30W, con eficiencia $>75\%$. La Cámara Imaging source (c) de modelo DFK 22BUCO3, posee una resolución de 744x480 (0.4MP), hasta 76 fps; obturador global; rango dinámico 8bits, además cuenta con sensor CMOS.

3.4. Metodología de trabajo

En la presente investigación se aplicará la siguiente metodología de trabajo resumida en el diagrama de flujo de la *Figura 18*.

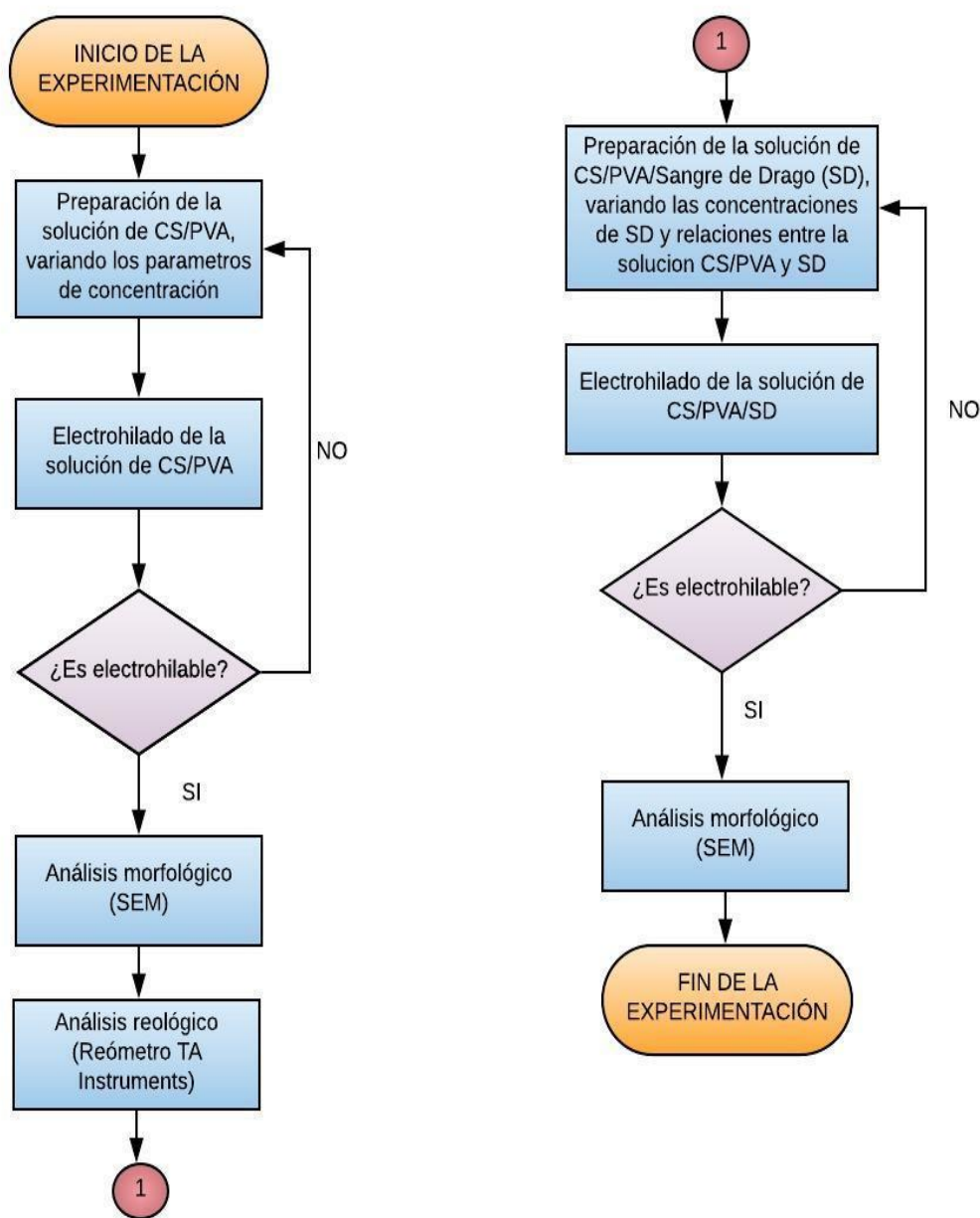


Figura 18. Diagrama de flujo de la experimentación

3.4.1. Preparación de la solución CS/PVA

Para preparar la solución de CS/PVA, se debe preparar antes la solución de quitosano y la solución de PVA por separado. Tales preparaciones se realizaron a diferentes concentraciones de los solutos, con el fin de encontrar las más idóneas para el proceso de electrohilado.

3.4.1.1. Preparación de la solución de quitosano (CS)

Para la preparación de la solución de quitosano, previamente debe ser preparada una solución ácido - acuosa de ácido acético y agua destilada, para lo cual se han ensayado soluciones con varias concentraciones de ácido acético, dichas soluciones se consiguieron mezclando X% de ácido acético (AA) v/v, para obtener un total de 10 ml de solución. Por ejemplo, para una solución de AA al 10%, se agrega 1 ml de AA y 9 ml de agua destilada, y se agita la mezcla levemente.

Una vez conseguida la solución ácido – acuosa antes mencionada, se procede a preparar la solución de quitosano, para lo cual se ejecutó el siguiente procedimiento:

- Dependiendo de la concentración que se desea ensayar, para X% de CS p/v, se pesan en la balanza electrónica 0.X g de quitosano y se los agrega en la solución de AA (10 ml). Por ejemplo, si se desea una solución de CS al 4%, entonces se pesan 0.4 g de quitosano.
- Con la ayuda de un agitador magnético y la plancha de agitación, se somete a la solución a agitación constante, hasta que la mezcla este homogénea (es decir que no existan fases apreciables, ni grumos), el tiempo de agitación depende de

la concentración de quitosano, sin embargo esta puede tardar entre 45 minutos (concentraciones bajas desde 1% a 5%) a 4 horas (concentraciones altas desde 6% en adelante).

- Cuando la mezcla esta homogénea, se procede a retirar el agitador magnético, y a dejar la solución en reposo, a una temperatura de 4° C durante 30 minutos (si se va a utilizar la mezcla enseguida, caso contrario la solución debe permanecer en refrigeración a 4°C), esto con el fin de eliminar las burbujas de aire que puedan quedar del proceso de agitación.
- Posteriormente, se extrae la solución de refrigeración, y se la deja reposar hasta que llegue a temperatura ambiente (*Figura 19*).

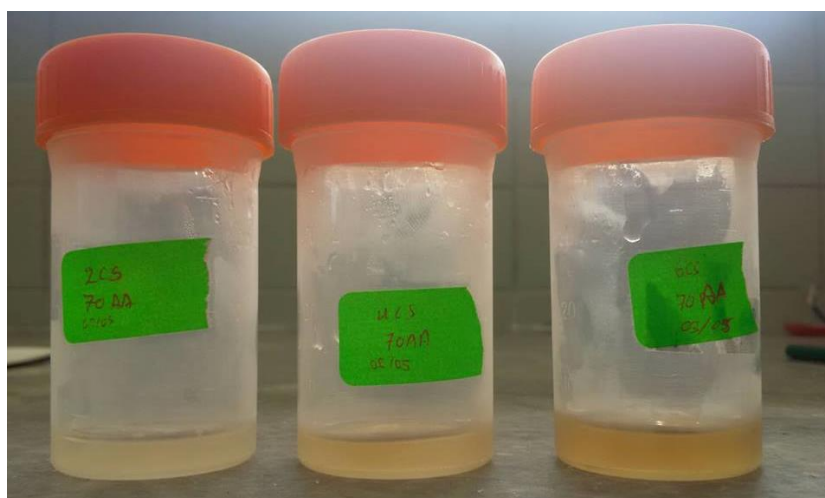


Figura 19. Soluciones de quitosano a diferentes concentraciones

3.4.1.2. Preparación de la solución de PVA

Para la preparación de la solución de PVA se deben seguir los siguientes pasos:

- Dependiendo de la concentración que se desea ensayar, para X% de PVA p/v, se pesan en la balanza electrónica 0.X g de PVA y se los agrega en 10 ml de agua destilada. Por ejemplo, si se desea una solución de PVA al 8%, entonces se pesan 0.8 g de PVA.
- Con la ayuda de un agitador magnético y la plancha de agitación, se somete a la solución a agitación y calentamiento constante hasta que la mezcla esté homogénea (es decir que no existan fases apreciables, ni grumos). La temperatura a la cual se debe realizar la agitación debe estar entre 80 y 90° C. En cuanto al tiempo de agitación, este varía dependiendo de la concentración de PVA, pudiendo estar en un rango de 1.5 horas (concentraciones bajas de 1% a 7%) a 1 día (concentraciones altas de 8% en adelante).
- Cuando la mezcla está homogénea, se procede a retirar el agitador magnético, y a dejar la solución en reposo, a temperatura ambiente, preferiblemente en un lugar oscuro (*Figura 20*).



Figura 20. Solución de PVA (10%).

Una vez que ambas soluciones se encuentren preparadas, se procede a preparar la solución de CS/PVA, esto se realiza en varias proporciones (30:70, 50:50 y 70:30 respectivamente), hasta encontrar la que mejor se ajuste al proceso de electrohilado.

3.4.2. Preparación de la solución de CS/PVA/SD

Una vez definidos los parámetros idóneos de la solución CS en AA + PVA, se procede a preparar la solución de CS en AA + PVA + sangre de drago. Para lo cual se ensayaron soluciones de sangre de drago a distintas concentraciones, hasta encontrar la más óptima, para ello se realiza lo siguiente:

- Dependiendo de la concentración que se desea ensayar, para X% de sangre de drago v/v, se miden 0.X ml de sangre de drago y se agrega agua destilada para obtener 1 ml de solución. Por ejemplo, si se desea una solución de sangre de drago al 60%, entonces se miden 0.6 ml de sangre de drago.

- Posteriormente, se procede a mezclar las soluciones de (CS en AA + PVA) + sangre de drago, en diferentes proporciones (1:1, 2:1 y 3:1, respectivamente), es decir, si tenemos una relación 2:1 se debe mezclar 2 ml de la solución CS en AA + PVA con 1 ml de la solución de sangre de drago en agua
- Se somete la solución a agitación constante, hasta obtener una mezcla homogénea.

3.4.3. Electrohilado de la solución

Una vez que se obtengan las soluciones que se pretenden ensayar, se procede a realizar el proceso de electrohilado, mismo que consta de varios parámetros, que deberán ser ajustados en la marcha, con el fin de evidenciar una correcta formación de las etapas del electrohilado y una consecuente obtención de membranas nano o microfibras cuya morfología sea la adecuada. Para lo cual se deben seguir los siguientes pasos:

- Colocar la solución en una jeringa de 10 ml, procurar que en el proceso exista la menor cantidad posible de aire (burbujas) en la solución, ya que esto afectará la continuidad del proceso de inyección.
- Colocar el capilar en la jeringa, y este conjunto en la bomba inyectora, ajustar debidamente la jeringa.
- Preparar el plato de recolección, cubriéndolo con papel aluminio o gasa, con el fin de facilitar la extracción de la membrana.

- Ajustar la posición de la luz y la cámara hasta obtener una imagen clara de la punta del capilar, con el fin de observar la correcta formación del cono de Taylor y evidenciar interrupciones del proceso de electrohilado.
- Colocar el polo positivo de la fuente de alto voltaje en el capilar y el polo negativo en el plato de recolección.
- Colocar el plato colector a una distancia entre 12 y 16 cm de la punta del capilar.
- Setear el caudal entre 0.2 y 1 ml/h y aplicar un voltaje a fin de generar un cono de Taylor estable, el voltaje podrá variar entre 8 y 21 Kv.
- Electro hilar la solución por aproximadamente 2 horas para tener una membrana manejable.
- Recolectar una muestra de 3 x 3 cm en una caja Petri, para su futuro análisis morfológico en el microscopio electrónico de barrido (SEM).

3.4.4. Caracterización

3.4.4.1. Caracterización morfológica

El análisis morfológico de la membrana, nos ayuda a observar la distribución y las dimensiones que poseen las fibras, ya que estas son imperceptibles al ojo humano. Para ello el CENCINAT de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, colaboró en la caracterización de las fibras extraídas durante el proceso, utilizando el microscopio electrónico de barrido (SEM) (*Figura 21*), de marca TESCAN MIRA 3XM, con aumento de 1x1'000 000x a 30 kV y resolución en modo de alto vacío de 1,2 nm a 30 kV; 2,5 nm a 3 kV.



Figura 21. Microscopio electrónico de barrido (SEM)

Fuente: (Melo, 2018)

3.4.4.2. Caracterización reológica

Para el análisis reológico de la solución de CS/PVA se utiliza un reómetro de TA Instruments (*Figura 22*), en el Laboratorio de Reología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Este posee un torque máximo de 200 mN·m, una resolución de torque de 0.1 mN·m. y una velocidad angular máxima de 300 rad/s.

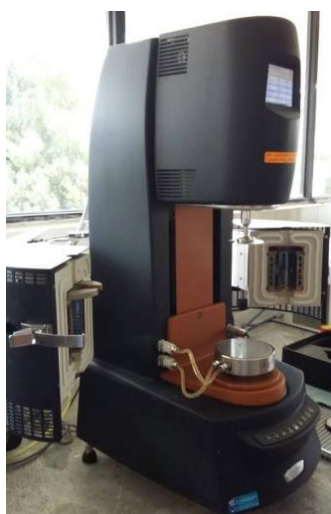


Figura 22. Reómetro TA Instruments.

Para el análisis se usó una configuración plato/cono. En cada muestra analizada se utilizó aproximadamente 2 ml de solución. Como primera fase, se realiza una pre-cizalla con una duración de 100 s a 25° C y una velocidad de cizalla constante de 1 rad/s para las muestras de quitosano en ácido acético se va variando la concentración de ácido acético (1% v/v y 70% v/v) y para la muestra de PVA (10% w/v). Para las demás muestras la velocidad de cizalla es dependiente de la concentración de quitosano en la solución (1 rad/s, 45 rad/s y 50 rad/s), debido a la viscosidad que cada solución de quitosano en ácido acético presenta, se debe variar la velocidad, con el fin de que la muestra se distribuya uniformemente entre las geometrías dispuestas y para establecer un estado reológico uniforme. Como segunda fase, se realiza un estudio de flujo estacionario, para las primeras tres muestras se utilizó tasas de cizallamiento que van desde 0.01 hasta 500 s⁻¹. Para las muestras restantes se usaron velocidades angulares que de igual forma dependen de la concentración de quitosano en ácido acético en la solución con PVA, estas velocidades van desde 0.01 hasta 60 rad/s, 0.01 hasta 70 rad/s y 0.01 hasta 75 rad/s. Obteniendo de ésta manera una gráfica viscosidad vs tasa de cizalla, que define el comportamiento reológico de la solución analizada. Cabe destacar que se realizaron tres ensayos por cada concentración de solución de quitosano en ácido acético, con el fin de obtener repetibilidad en los resultados.

CAPITULO IV

ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. Solubilidad del quitosano

Según la bibliografía (Romanazzi et al., 2009), el quitosano es soluble en soluciones ácido - acuosas, mismas que pueden utilizar ácidos orgánicos e inorgánicos. En esta investigación se utilizó ácido acético glacial a diferentes concentraciones, con el fin de comprobar la solubilidad del quitosano, y su efecto en la electrohilabilidad de la solución conformada. Se realizaron ensayos con concentraciones de soluciones ácido – acuosas variando en un rango desde 1% de ácido acético v/v hasta 70% de ácido acético v/v. Tras la realización de estos ensayos, se determinó que el quitosano es soluble en todas las concentraciones de ácido acético, sin embargo el tiempo para obtener una solución homogénea disminuye a medida que la concentración de ácido en la solución incrementa, este comportamiento se puede evidenciar en la siguiente grafica (*Figura 23*).

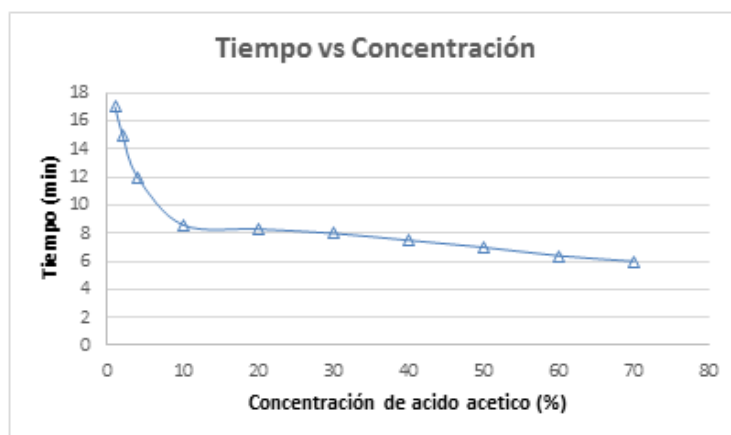


Figura 23. Gráfica: tiempo vs concentración de AA.

La grafica anterior fue realizada para una concentración de quitosano de 2% w/v, cabe recalcar que para concentraciones mayores, los tiempos también incrementarán, sin embargo la tendencia descendente del tiempo mientras mayor sea la concentración de ácido acético, se mantendrá. Aunque a simple vista, las soluciones parezcan estar mezcladas homogéneamente, se recomienda sin embargo prolongar el tiempo de mezcla de la solución por un periodo aproximado de 5 a 10 minutos, seguido de una etapa de reposo y refrigeración.

4.2. Membranas de CS en AA+ PVA

4.2.1. Electrohilabilidad

Para realizar las pruebas de electrohilabilidad se empezó manteniendo constante dos de los parámetros, hasta conseguir estabilidad en el proceso de electrohilado y se logre formar el cono de Taylor. En los primeros ensayos se mantuvo constante la concentración de PVA (empezando con 4% w/v) y la concentración de quitosano en ácido acético (empezando con 2% w/v), variando la concentración de ácido acético en 1% v/v, 2% v/v, 4% v/v y 10% v/v en agua, obteniendo resultados poco favorables. Se empezó a tener estabilidad en el proceso de electrohilado aumentando la concentración de quitosano en 4% w/v en 2% v/v de ácido acético en agua + PVA en 8% w/v, sin embargo no se pudo formar el cono, por lo tanto la solución se considera no electrohilable estos resultados lo podemos ver en la *Tabla 6*.

Tabla 6.*Variación de parámetros (primera aproximación)*

| CONCENTRACIÓN | | | RELACIÓN | Electrohilable | OBSERVACIONES |
|---------------|------------------|-----|----------|----------------|---|
| PVA w/v | CS w/v en AA v/v | | PVA+CS | | |
| 4% | 2% | 10% | 1:1 | NO | No existe estabilidad en el proceso de electrohilado, no existe formación del cono de Taylor. |
| 4% | 2% | 10% | 2:1 | NO | |
| 4% | 2% | 1% | 1:1 | NO | |
| 4% | 2% | 10% | 2:1 | NO | |
| 4% | 2% | 1% | 1:1 | NO | |
| 4% | 2% | 1% | 2:1 | NO | |
| 4% | 2% | 4% | 1:1 | NO | |
| 4% | 3% | 2% | 1:1 | - | Es más estable pero no se forma cono, no se logra recolectar fibras |
| 2% | 3% | 2% | 1:1 | - | |
| 2% | 3% | 2% | 2:1 | - | |
| 8% | 3% | 2% | 1:1 | - | |
| 4% | 4% | 2% | 1:1 | SI | Es más estable, no se forma cono, se recolectan fibras |
| 8% | 4% | 2% | 1:1 | SI | |

Tras la realización de estos ensayos se pudo evidenciar que mientras mayor es la concentración de PVA en agua, el proceso de electrohilado tiende a tener mayor estabilidad, por lo cual se realizaron pruebas adicionales aumentando la concentración de este polímero y variando la concentración de ácido acético, por lo que en una segunda aproximación se mantuvo constante la concentración de PVA en agua en un 10% w/v, la concentración de quitosano en ácido acético en un 4% w/v y variando la concentración de ácido acético en agua, pero esta vez se decidió incrementar radicalmente su concentración desde 40% v/v hasta 70% v/v, obteniendo como resultado que la solución se electrohiló cuando se tiene una concentración de ácido acético en agua mayor a 50% v/v.

Una vez determinada la concentración de ácido acético en agua ideal para el proceso, se varió la concentración de PVA en agua para poder determinar desde qué concentración la solución es electrohilable, por lo que se utilizó concentraciones de 4% w/v y 8% w/v de PVA, teniendo como resultado que la solución no es electrohilable con una concentración de 4% w/v de PVA en agua destilada, estos resultados lo podemos visualizar en la *Tabla 7*.

Tabla 7.

Variación de parámetros (segunda aproximación)

| CONCENTRACIÓN | | | RELACIÓN | Voltaje (kV) | Caudal (ml/h) | Electrohilable |
|---------------|---------------------|-----|----------|-----------------|------------------|----------------|
| PVA w/v | CS w/v en AA v/v | | PVA+CS | | | |
| 10% | 4% | 40% | 1:1 | 22 | 0.5 | NO |
| 10% | 4% | 50% | 1:1 | 21.3 | 0.6 | SI |
| 10% | 4% | 60% | 1:1 | 16.5 | 0.5 | SI |
| 10% | 4% | 70% | 1:1 | 18.4 | 0.3 | SI |
| 8% | 4% | 50% | 1:1 | 16 | 0.4 | SI |
| 8% | 4% | 60% | 1:1 | 16.5 | 0.5 | SI |
| 8% | 4% | 70% | 1:1 | 18.9 | 0.4 | SI |
| 4% | 4% | 50% | 1:1 | 19.6 | 0.2 | NO |
| 4% | 4% | 60% | 1:1 | 15.9 | 0.5 | NO |

Al determinar la concentración de PVA ideal para el proceso de electrohilado, se varió la concentración de quitosano en ácido acético, en esta ocasión se varió el quitosano desde 2% w/v hasta 10% w/v en intervalos de 2% como lo podemos visualizar en la *Tabla 8*, el resultado que se obtuvo fue favorable, ya que en todas las concentraciones la solución se electrohiló como podemos visualizar en la *Figura 24*, no obstante en altas concentraciones de quitosano en ácido acético, no es recomendable

el proceso de electrohilado debido a la alta viscosidad de las soluciones, factor que dificulta la estabilidad del mismo.



Figura 24. Membrana recolectada sobre gasa

Tabla 8.

Variación de parámetros (tercera aproximación)

| CONCENTRACIÓN | | | RELACIÓN | Voltaje (kV) | Caudal (ml/h) | Electrohilable |
|---------------|--------------|-----|----------|--------------|---------------|----------------|
| PVA w/v | CS w/v en AA | v/v | PVA+CS | | | |
| 10% | 2% | 70% | 1:1 | 15.3 | 0.35 | SI |
| 10% | 6% | 70% | 1:1 | 19.6 | 0.2 | SI |
| 10% | 8% | 70% | 1:1 | 18.4 | 0.2 | SI |
| 10% | 10% | 70% | 1:1 | 21.1 | 0.1 | SI |

En la solución de 10% w/v de quitosano en ácido acético + 10% w/v de PVA, se encontró mayor estabilidad cuando se usó un caudal de 0.1 ml/h y 21.1 kV de voltaje, no obstante, empezando el proceso se pudo estabilizar con dos combinaciones más de parámetros: caudal de 0.8 ml/h y voltaje de 23.7 kV y caudal de 2 ml/h y 28.8 kV de voltaje.

4.2.2. Análisis Morfológico

Una vez que se obtuvieron resultados favorables en el proceso de electrohilado, se procedió a comprobar la morfología de las fibras submicrométricas presentes en las membranas recolectadas.

4.2.2.1. Manteniendo constante las concentraciones de CS (4% w/v) en solución de ácido acético + PVA (10% w/v) en agua destilada

- *Solución de: CS 4% w/v en Ácido acético 50% v/v + PVA 10% w/v en agua.*

Tabla 9.

Parámetros del proceso (CS 4% en AA 50% + PVA 10%)

| Parámetros del proceso | |
|------------------------------|------------|
| Voltaje | 21.3 kV |
| Caudal | 0.6 ml/h |
| Distancia colector – capilar | 12 cm |
| Campo eléctrico | 177.5 kV/m |

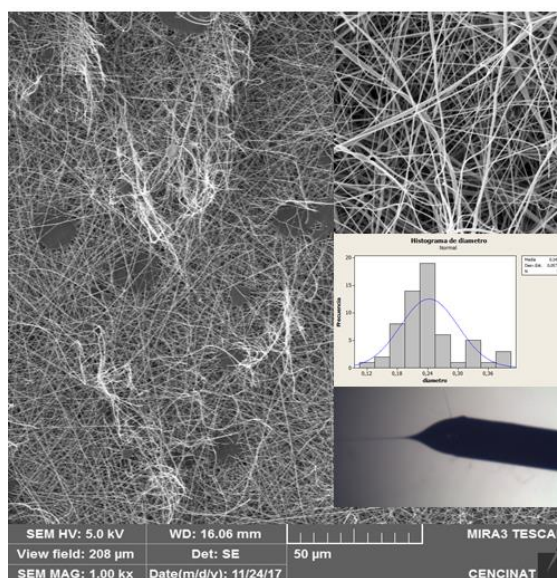


Figura 25. Resultados del proceso (CS 4% en AA 50% + PVA 10%)

Se obtuvieron fibras cuyo diámetro promedio es de 243 ± 57 nm, en la *Figura 25*, se puede observar que existen zonas con humedad, es decir, zonas que no están secas completamente (zonas en las cuales no hay presencia de fibras, con un color gris opaco), lo que implica que el caudal utilizado para esta solución fue elevado, por lo que el solvente no se pudo evaporar completamente antes de llegar al plato recolector. Sin embargo se puede apreciar en la imagen aumentada (esquina superior derecha), que las fibras son lisas y continuas aunque no presentan uniformidad en los diámetros.

- *Solución de: CS 4% w/v en Ácido acético 60% v/v + PVA 10% w/v en agua.*

Tabla 10.

Parámetros del proceso (CS 4% en AA 60% + PVA 10%)

| Parámetros del proceso | |
|------------------------------|------------|
| Voltaje | 16.5 kV |
| Caudal | 0.5 ml/h |
| Distancia colector – capilar | 12 cm |
| Campo eléctrico | 137.5 kV/m |

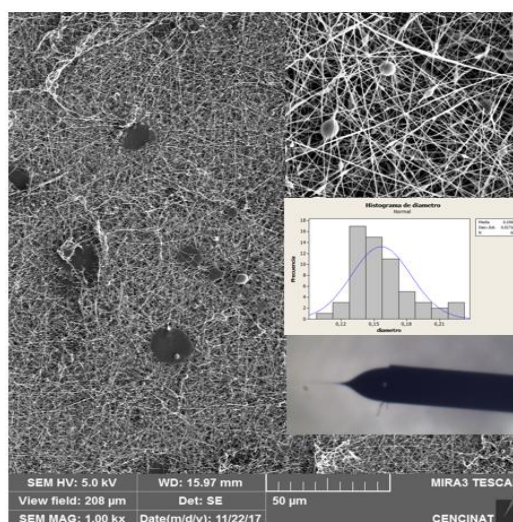


Figura 26. Resultados del proceso (CS 4% en AA 60% + PVA 10%)

De manera similar al proceso anterior, se observa la existencia de zonas con humedad en la *Figura 26*, y esta vez existe además la presencia de beads (perlas) en las fibras, esto se debe al caudal utilizado, que en este caso es elevado. El voltaje también tiene influencia en la aparición de beads, pues al parecer fue insuficiente para el caudal implementado (contrastando con los parámetros del proceso anterior). El diámetro promedio de las fibras obtenidas es de 156 ± 27 nm.

- *Solución de: CS 4% w/v en Ácido acético 70% v/v + PVA 10% w/v en agua.*

Tabla 11.

Parámetros del proceso (CS 4% en AA 70% + PVA 10%)

| Parámetros del proceso | |
|------------------------------|------------|
| Voltaje | 18.4 kV |
| Caudal | 0.3 ml/h |
| Distancia colector – capilar | 12 cm |
| Campo eléctrico | 153.3 kV/m |

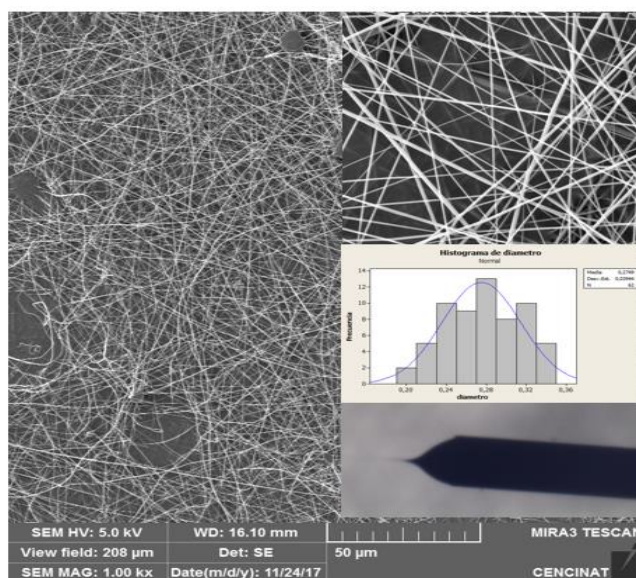


Figura 27. Resultados del proceso (CS 4% en AA 70% + PVA 10%)

Se obtuvieron fibras con un diámetro promedio de 275 ± 39 nm en la *Figura 27*, se observa la presencia de zonas húmedas, de menor tamaño en comparación a los dos ensayos anteriores, además en la imagen aumentada se puede observar que las fibras presentan una morfología lisa, aunque no presenta poca uniformidad entre los diámetros, ya que no posee una elevada desviación. En este ensayo podemos destacar la influencia positiva del caudal (0.3 ml/h, que es menor en comparación a los anteriores) y también de la concentración de ácido acético (70% v/v) en la obtención de fibras con morfología adecuada.

En el siguiente apartado, se procede a verificar la morfología de las fibras resultantes al disminuir la concentración de PVA en la solución con agua (de 10% w/v a 8% w/v), la concentración de quitosano en ácido acético se mantiene (4% w/v) y se varía la concentración de ácido acético en agua. Esto con el fin de determinar cómo influye la concentración de PVA en la obtención de fibras con morfologías adecuadas, y si es factible o no disminuir en mayor cantidad la concentración de este polímero en la solución.

4.2.2.2. Manteniendo constante las concentraciones de CS (4% w/v) en ácido acético + PVA (8% w/v) en agua

- Solución de: CS 4% w/v en Ácido acético 50% v/v + PVA 8% w/v en agua.

Tabla 12.

Parámetros del proceso (CS 4% en AA 50% + PVA 8%)

| Parámetros del proceso | |
|------------------------------|------------|
| Voltaje | 16 kV |
| Caudal | 0.4 ml/h |
| Distancia colector – capilar | 12 cm |
| Campo eléctrico | 133.3 kV/m |

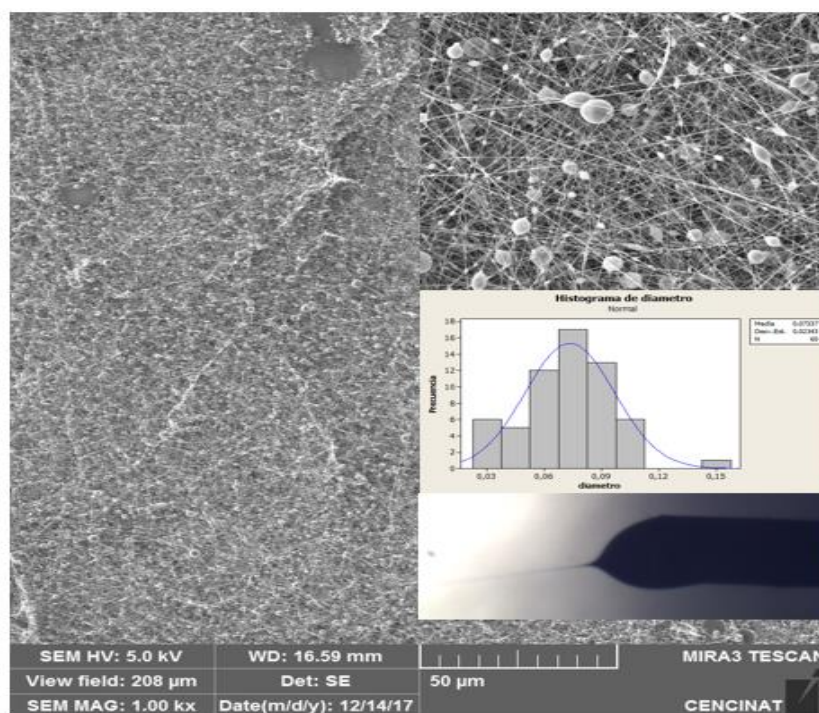


Figura 28. Resultados del proceso (CS 4% en AA 50% + PVA 8%)

Se puede apreciar en la *Figura 28*, la coexistencia de nanofibras y beads. Las fibras no poseen una morfología óptima, en parte esto se debe a la disminución de la concentración de PVA en agua, lo que dificulta la fibrilación de la solución a causa de la disminución de la viscosidad. Las fibras obtenidas tienen un diámetro promedio de 73 ± 23 nm.

- *Solución de: CS 4% w/v en Ácido acético 60% v/v + PVA 8% w/v en agua.*

Tabla 13.

Parámetros del proceso (CS 4% en AA 60% + PVA 8%)

| Parámetros del proceso | |
|------------------------------|------------|
| Voltaje | 16.5 kV |
| Caudal | 0.5 ml/h |
| Distancia colector – capilar | 12 cm |
| Campo eléctrico | 137.5 kV/m |

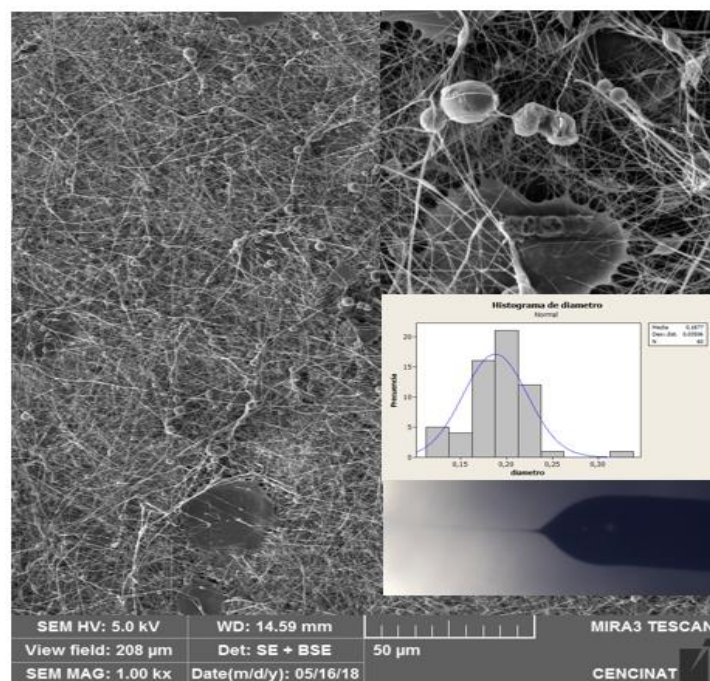


Figura 29. Resultados del proceso (CS 4% en AA 60% + PVA 8%)

En la *Figura 29*, se evidencian zonas húmedas, fibras discontinuas que presentan beads en menor proporción que en el ensayo anterior. Las fibras sin embargo presentan una superficie lisa y poseen un diámetro promedio de 187 ± 35 nm.

- *Solución de: CS 4% w/v en Ácido acético 70% v/v + PVA 8% w/v en agua.*

Tabla 14.

Parámetros del proceso (CS 4 en AA 70 + PVA 8%)

| Parámetros del proceso | |
|------------------------------|------------|
| Voltaje | 18.9 kV |
| Caudal | 0.4 ml/h |
| Distancia colector – capilar | 12 cm |
| Campo eléctrico | 157.5 kV/m |

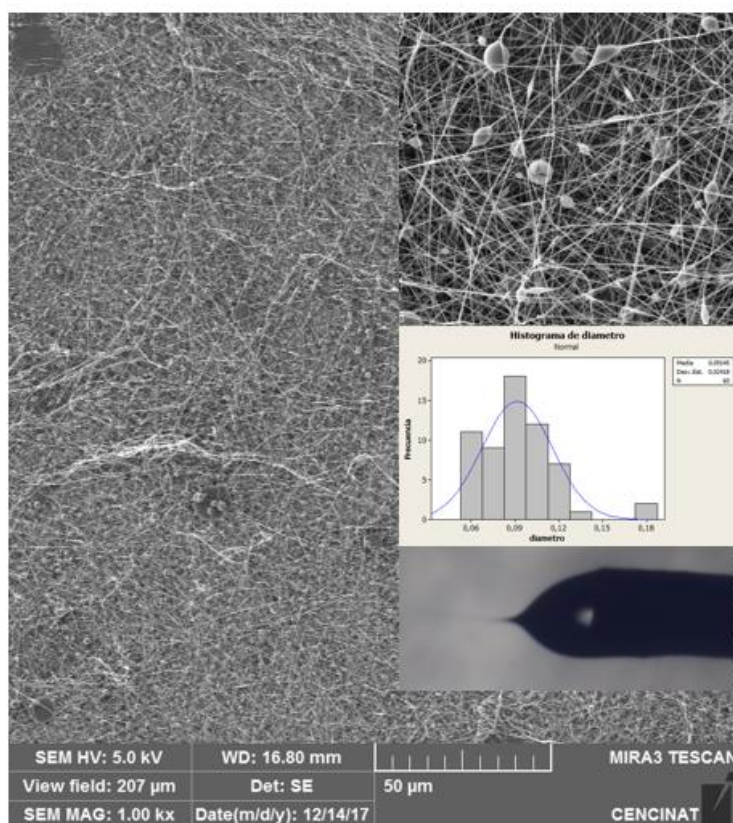


Figura 30. Resultados del proceso (CS 4 en AA 70 + PVA 8%)

Se obtuvieron fibras con un diámetro promedio de 91 ± 24 nm, en este ensayo, como podemos ver en la *Figura 30*, las fibras presentan mejor apariencia en comparación a los dos últimos ensayos, aunque de igual manera presentan beads. Al parecer la concentración de ácido acético mejora las características morfológicas de las fibras, esto puede deberse a la disminución de la tensión superficial de la solución y ligero incremento de la viscosidad (Geng, Kwon, & Jang, 2005), que facilitan la formación de fibras, de igual manera, se evidencia que la disminución de la concentración de PVA en agua, tiene un efecto negativo en electrohilabilidad de la solución, sin embargo, permite obtener fibras de menor diámetro, lo que es deseable en ciertas aplicaciones (Filtración de agua y aire).

4.2.2.3. Manteniendo constante las concentraciones de PVA (10% w/v) en agua y ácido acético (70% v/v) en agua

- *Solución de: CS 2% w/v en Ácido acético 70% v/v + PVA 10% w/v en agua.*

Tabla 15.

Parámetros del proceso (CS 2% en AA 70% + PVA 10%)

| Parámetros del proceso | |
|-------------------------------------|------------|
| Voltaje | 15.3 kV |
| Caudal | 0.35 ml/h |
| Distancia colector – capilar | 12 cm |
| Campo eléctrico | 127.5 kV/m |

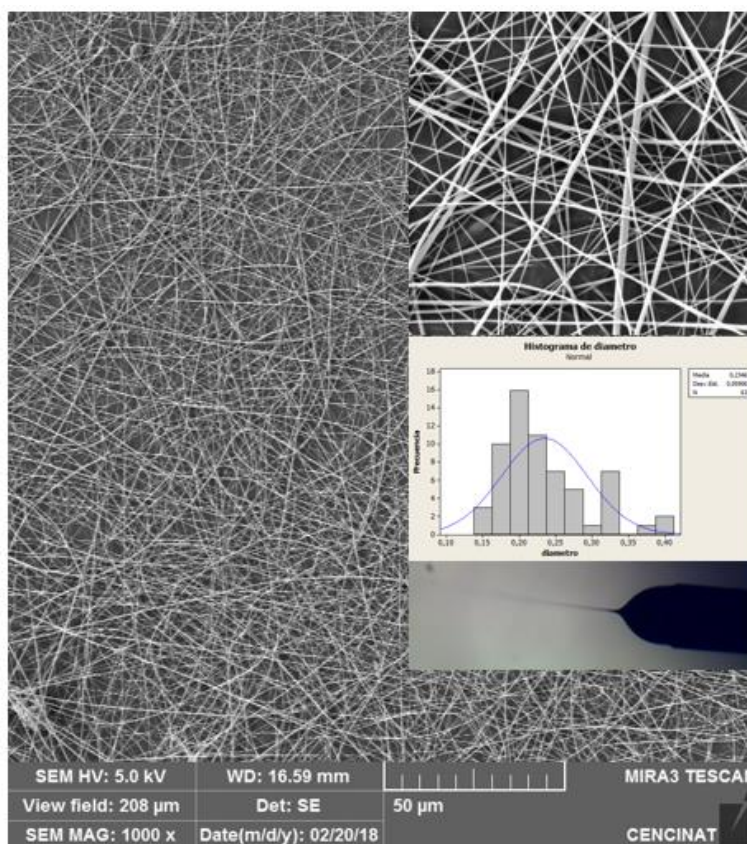


Figura 31. Resultado del proceso (CS 2% en AA 70% + PVA 10%)

Se obtuvieron fibras con un diámetro promedio de 234 ± 59 nm, dichas fibras poseen una excelente apariencia, sin bien su distribución es aleatoria a lo largo de la membrana la continuidad de las fibras es evidente y su superficie es lisa. En la *Figura 31* no se visualizan zonas humedad ni formación de beads por lo que los parámetros implementados se pueden definir como adecuados para el proceso de electrohilado.

- Solución de: CS 6% w/v en Ácido acético 70% v/v + PVA 10% w/v en agua.

Tabla 16.

Parámetros del proceso (CS 6% en AA70 + PVA 10%)

| Parámetros del proceso | |
|------------------------------|------------|
| Voltaje | 19.6 kV |
| Caudal | 0.2 ml/h |
| Distancia colector – capilar | 12 cm |
| Campo eléctrico | 163.3 kV/m |

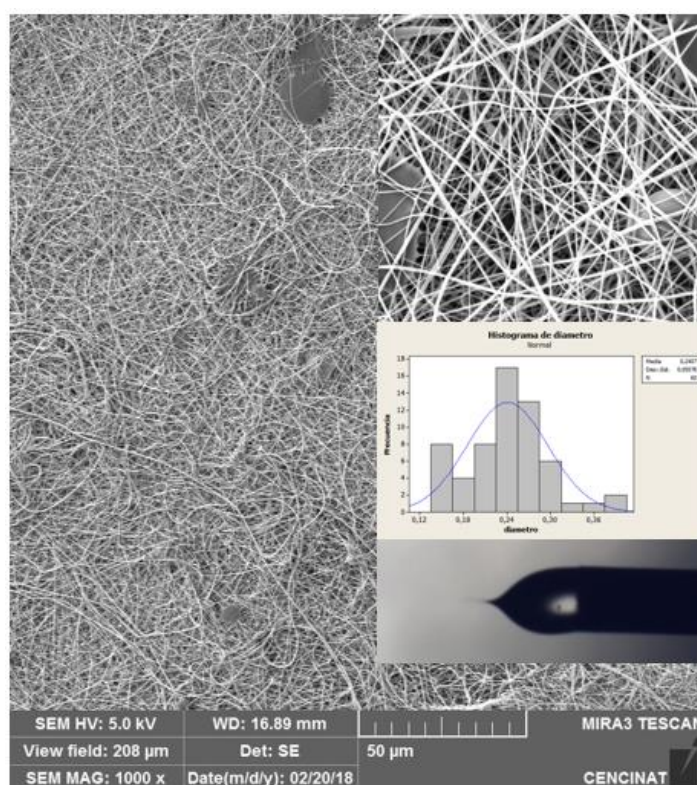


Figura 32. Resultados del proceso (CS 6% en AA70 + PVA 10%)

En este ensayo se obtuvieron fibras de superficie lisa con un diámetro promedio de 240 ± 56 nm, se puede evidenciar un incremento en el diámetro de las fibras de 6 nm con respecto al ensayo anterior, la apariencia de las fibras es buena, sin embargo se

observar en la *Figura 32* la presencia de zonas húmedas en la membrana, aun cuando el caudal es bajo, esto pudo deberse a goteos en el proceso de electrohilado.

- *Solución de: CS 8% w/v en Ácido acético 70% v/v + PVA 10% w/v en agua.*

Tabla 17.

Parámetros del proceso (CS 8% en AA 70% + PVA 10%)

| Parámetros del proceso | |
|------------------------------|------------|
| Voltaje | 18.4 kV |
| Caudal | 0.2 ml/h |
| Distancia colector – capilar | 12 cm |
| Campo eléctrico | 153.3 kV/m |

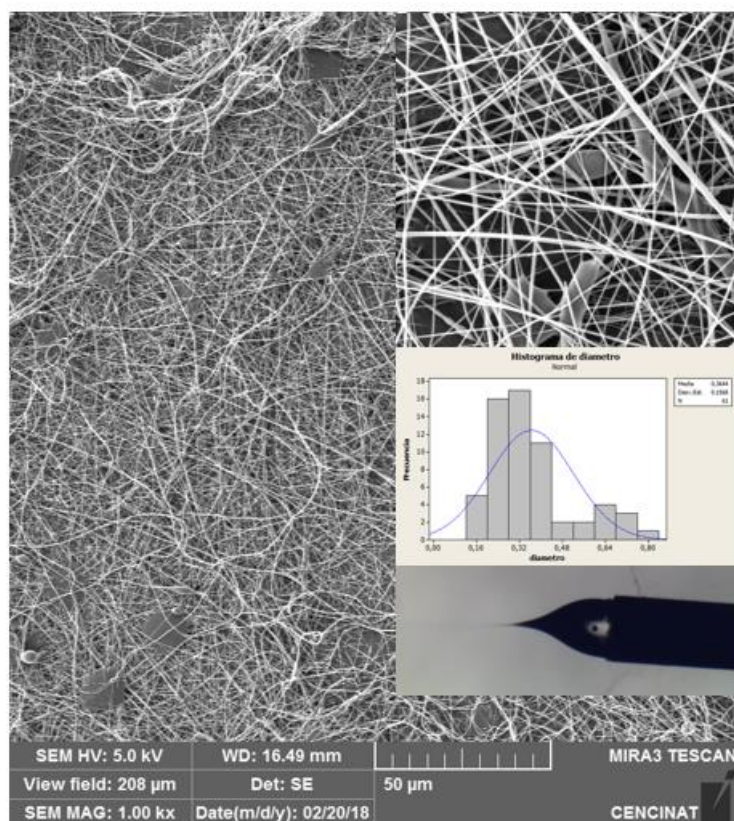


Figura 33. Resultados del proceso (CS 8% en AA 70% + PVA 10%)

En la *Figura 33*, se puede evidenciar al igual que en el ensayo anterior, zonas húmedas producidas por la misma razón antes mencionada. Se obtuvieron fibras con un diámetro promedio de 364 ± 57 nm que poseen superficie lisa, aunque se nota la presencia de beads (muy escasos). Se puede apreciar un incremento significativo en el diámetro de las fibras respecto al ensayo anterior (124 nm).

- *Solución de: CS 10% w/v en Ácido acético 70% v/v + PVA 10% w/v en agua*

Tabla 18.

Parámetros del proceso (CS 10% en AA 70% + PVA 10%)

| Parámetros del proceso | |
|------------------------------|------------|
| Voltaje | 21.1 kV |
| Caudal | 0.1ml/h |
| Distancia colector – capilar | 12 cm |
| Campo eléctrico | 175.8 kV/m |

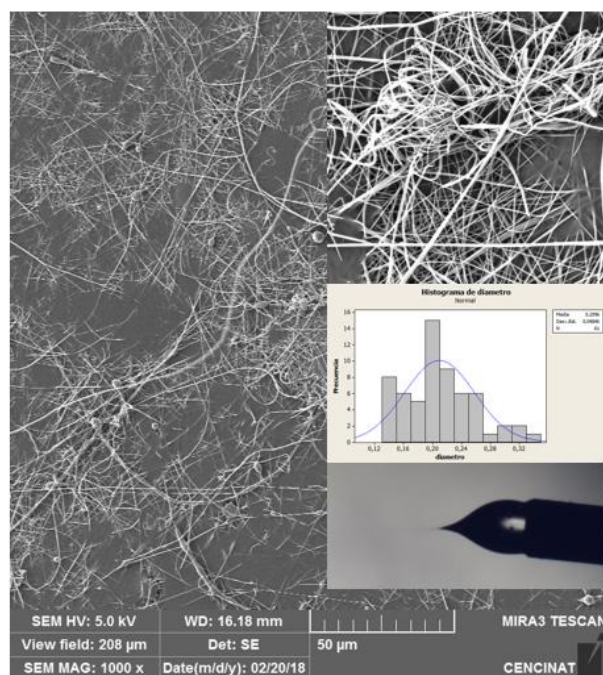


Figura 34. Resultados del proceso (CS 10% en AA 70% + PVA 10%)

Se puede apreciar en la *Figura 34* extensas zonas húmedas, y poca formación de fibras, lo que pone en evidencia un proceso de difícil control, goteos continuos y estabilidad del Jet intermitente, lo que ocasiona fibras discontinuas y con un desorden evidente (enmarañadas). Debido a que las fibras son pocas, su medición fue deficiente y rompen la tendencia de diámetro creciente que se tuvo en los ensayos anteriores, el diámetro promedio de las fibras fue de 209 ± 48 nm.

De los ensayos realizados en esta última etapa, se pudo definir el rango en el cual la concentración de quitosano en ácido acético en la solución con PVA, permite la formación adecuada de fibras nanométricas. Se observa que a medida que incrementa la concentración de quitosano en ácido acético en la solución, el proceso de electrohilado se torna inestable, esto se debe al incremento en la viscosidad de las soluciones, por reacción al ácido utilizado. De tal manera se define que el rango idóneo de concentración de quitosano en ácido acético que puede ser electrohilado con éxito va de 2% hasta 8% w/v, aun así los procesos con soluciones cuya concentración de quitosano en ácido acético sea mayor a 4% w/v deben ser monitoreados constantemente. Es evidente entonces que los parámetros de solución que arrojaron los resultados más favorables en el proceso de electrohilado, fueron: CS 2% w/v en AA 70% v/v en agua + PVA 10% w/v en agua. Como muestra de esta aseveración, en la *Figura 35*, se observa una membrana electrohilada de esta solución.



Figura 35. Membrana correspondiente a una solución de CS 2% w/v en AA 70% v/v + PVA 10% w/v

4.2.2.4. Comportamiento de las fibras, variando parámetros del proceso de electrohilado utilizando: CS 2% w/v en Ácido acético 70% v/v + PVA 10% w/v en agua

Al determinar la solución más idónea (CS 2% w/v en ácido acético 70% v/v + PVA 10% w/v) para realizar el proceso de electrohilado, se procede a realizar la experimentación, variando los parámetros operativos: caudal y voltaje, manteniendo constante la distancia del capilar al plato colector (12 cm). Esto se realiza con el fin de determinar el rango en el cual se pueden obtener fibras de morfología adecuada y con la menor cantidad de defectos posible.

Tras la experimentación se logró determinar el área (sombreada) en la cual cualquier combinación de los parámetros antes mencionados, arrojará resultados favorables, misma que se puede observar en la *Figura 36*. En la *Tabla 19*, se expone de manera más detallada los parámetros utilizados y las microscopías obtenidas, que marcan los límites superior e inferior del área óptima.

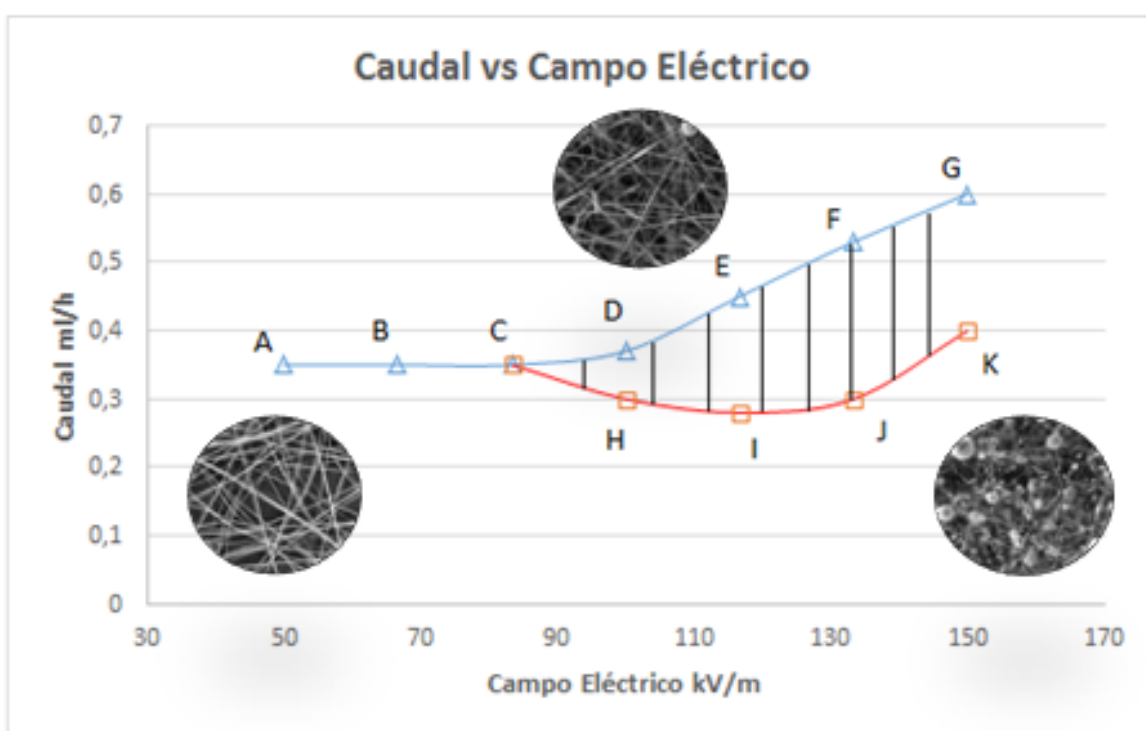
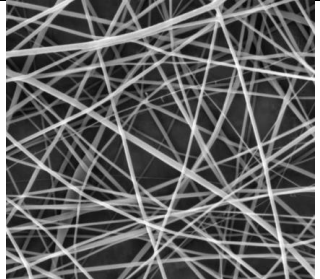
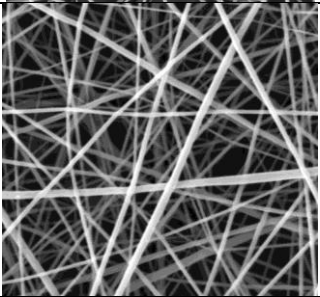
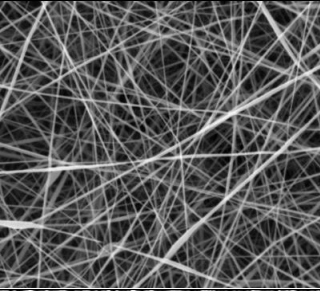
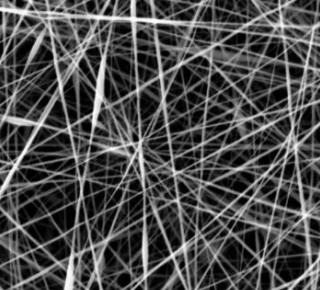


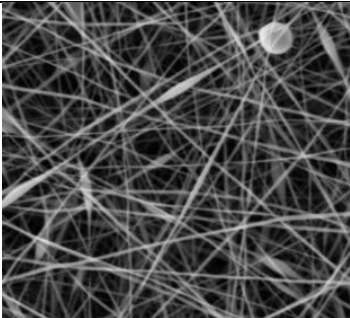
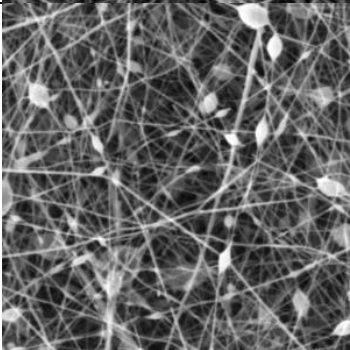
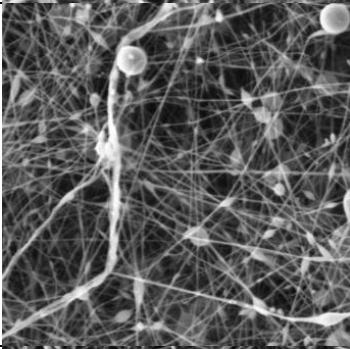
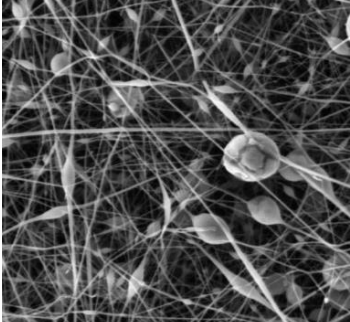
Figura 36. Gráfica: Caudal vs Campo eléctrico

Tabla 19.

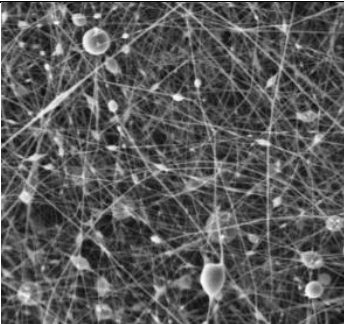
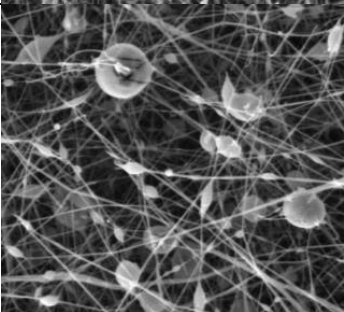
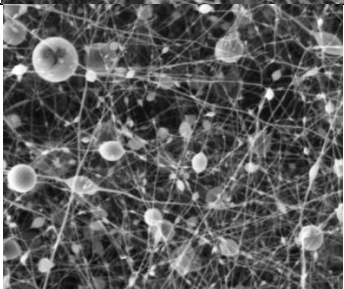
Parámetros que marcan los límites del proceso de electrohilado para solución CS 2% w/v en ácido acético 70% v/v + PVA 10% w/v

| Parámetros utilizados del proceso | | | | |
|-----------------------------------|---------------|------------------------|---|------------------------|
| Punto | Caudal (ml/h) | Campo eléctrico (kV/m) | Microscopía | Diámetro promedio (nm) |
| A | 0,35 | 50 |  | 240 ± 46 |
| B | 0,35 | 67 |  | 264 ± 58 |
| C | 0,35 | 83 |  | 157 ± 31 |
| D | 0,37 | 100 |  | 129 ± 28 |

CONTINÚA

| | | | | |
|---|------|-----|---|--------------|
| E | 0,45 | 117 |  | 141 ± 33 |
| F | 0,53 | 133 |  | 124 ± 44 |
| G | 0,6 | 150 |  | 84 ± 23 |
| H | 0,3 | 100 |  | 100 ± 31 |

CONTINÚA

| | | | | |
|---|------|-----|--|--------------|
| I | 0,28 | 117 |  | 120 ± 88 |
| J | 0,3 | 133 |  | 84 ± 35 |
| K | 0,4 | 150 |  | 91 ± 19 |

De la tabla expuesta anteriormente, se pueden realizar algunas observaciones importantes, del punto A al C se encuentran las mejores fibras, parece ser entonces que el caudal ideal para el proceso de electrohilado es 0.35 ml/h, sin embargo los puntos D y E también muestran fibras con buena apariencia pero ya empiezan a aparecer defectos (beads). Los puntos F y G, presentan fibras con muchos beads además de humedad, debido al incremento de caudal y voltaje además se aprecia una disminución del diámetro promedio de las fibras (debido al incremento en la fuerza de repulsión electrostática en el chorro). Del punto H al punto K, se observa que la disminución de caudal, ocasiona la coexistencia de fibras con beads y nanopartículas. Esto permite

tener una idea de los parámetros más favorables para evitar defectos y discontinuidades en las fibras.

4.2.3. Análisis reológico

Para el análisis reológico de las soluciones, se realizaron dos fases para cada ensayo como se explicó en el capítulo anterior. La primera fase fue una pre-cizalla para distribuir uniformemente la solución entre las geometrías dispuestas y para establecer un estado reológico uniforme. La segunda fase, fue un estudio de flujo estacionario, que permitió obtener gráficas viscosidad vs tasa de cizalla y esfuerzo de corte vs tasa de cizallamiento para definir el tipo de fluido con el que se trabajó. En la *Figura 37*, se observa el equipo utilizado y la muestra de la solución en posición previo al ensayo reológico.



Figura 37. Muestra de solución lista para ensayar

Se realizará un estudio sobre el comportamiento reológico de varias soluciones, empezando por analizar las gráficas viscosidad vs tasa de cizallamiento y esfuerzo de corte vs tasa de cizallamiento. Las soluciones ensayadas son seis en total: soluciones de CS al 2% w/v disuelto en ácido acético al 1% v/v y 70% v/v en agua, solución de PVA 10% w/v en agua y las soluciones que fueron electrohiladas que presentaron mejores morfologías, CS 2% w/v, CS 4% w/v y CS 6% w/v (todas disueltas en AA 70% v/v en agua) y mezcladas con PVA 10% w/v en agua en relación 1:1.

Seguidamente se realizará una comparación entre las gráficas viscosidad vs tasa de cizallamiento de las soluciones de quitosano con variación de la concentración de ácido acético, la solución de PVA y las soluciones cuya concentración de quitosano varía. Esto con el fin de observar el comportamiento de la viscosidad de las soluciones bajo la variación de la concentración tanto de la solución ácido acuosa utilizada así como de quitosano.

4.2.3.1. Graficas: Viscosidad vs Tasa de cizallamiento y Esfuerzo de corte vs Tasa de cizallamiento.

Se analizarán primero las gráficas de las soluciones de quitosano variando la concentración de ácido acético y de la solución de PVA.

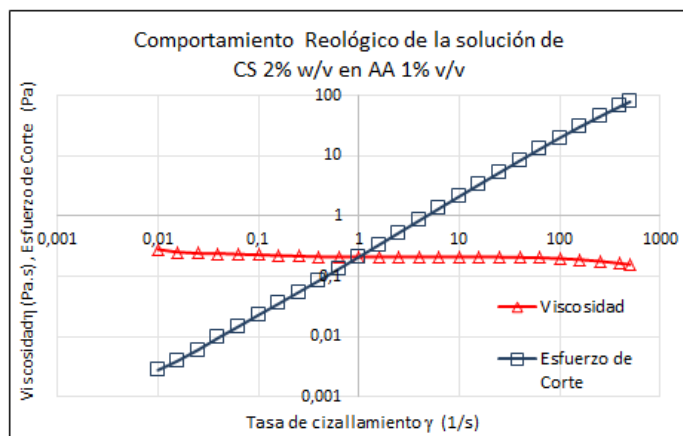


Figura 38. Grafica correspondiente a solución de CS 2% w/v en AA 1% w/v

De la gráfica anterior (*Figura 38*), se puede verificar que el esfuerzo de corte no tiene una relación lineal frente a la tasa de cizallamiento y que la viscosidad del fluido decrece y el esfuerzo de corte aumenta a medida que incrementa la tasa de cizallamiento. Estas características particulares son propias de los fluidos no newtonianos pseudoplásticos (que es el caso de la mayoría de polímeros), tal como se puede observar en la *Figura 39*.

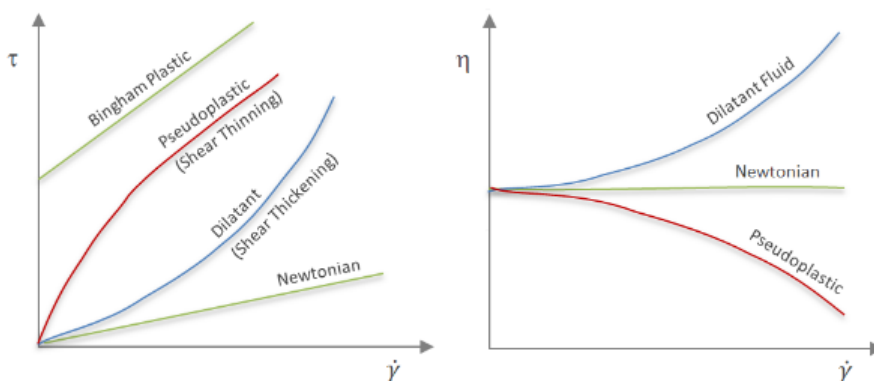


Figura 39. Comportamientos característicos de los fluidos no newtonianos

Fuente: (Polymer Database, 2015)

A continuación se observa el comportamiento que muestran las dos soluciones restantes (*Figura 40 y 41*).

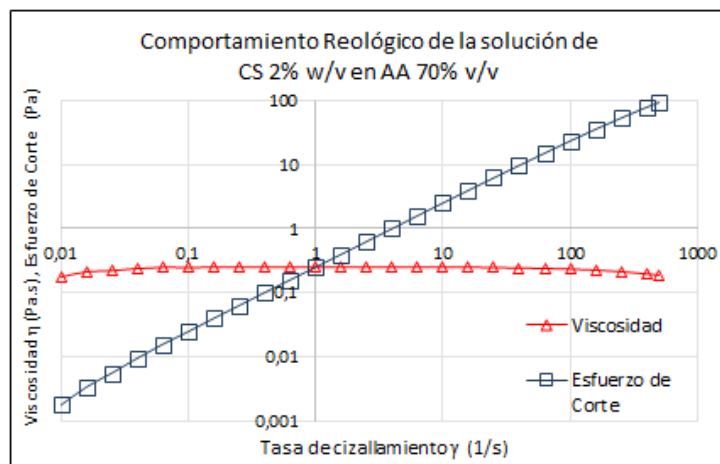


Figura 40. Grafica correspondiente a solución de CS 2% w/v en AA 70% w/v

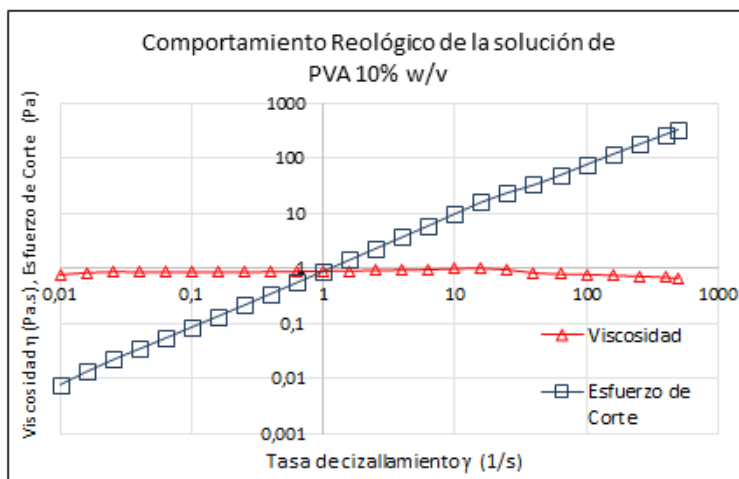


Figura 41. Grafica correspondiente a solución de PVA 10% w/v

Se verifica entonces lo esperado, las dos soluciones restantes son fluidos no newtonianos pseudoplásticos ya que tienen el mismo comportamiento que se observa

en la *Figura 39*, esfuerzo de corte no lineal, viscosidad decreciente y esfuerzo de corte creciente en relación al aumento de la tasa de cizallamiento.

Por tanto se puede esperar el mismo comportamiento para las soluciones que presentaron morfologías adecuadas al ser electrohiladas. En la *Figura 42 a), b) y c)*, se observan las gráficas para las soluciones de: CS 2% w/v + PVA 10% w/v (1:1), CS 4% w/v + PVA 10% w/v (1:1) y CS 6% w/v + PVA 10% w/v (1:1) respectivamente¹. Las tres graficas poseen el mismo comportamiento no newtoniano pseudoplástico, con la diferencia de que la viscosidad incrementa a medida que aumenta la concentración de quitosano en la solución, esto se podrá apreciar de mejor manera en el apartado siguiente.

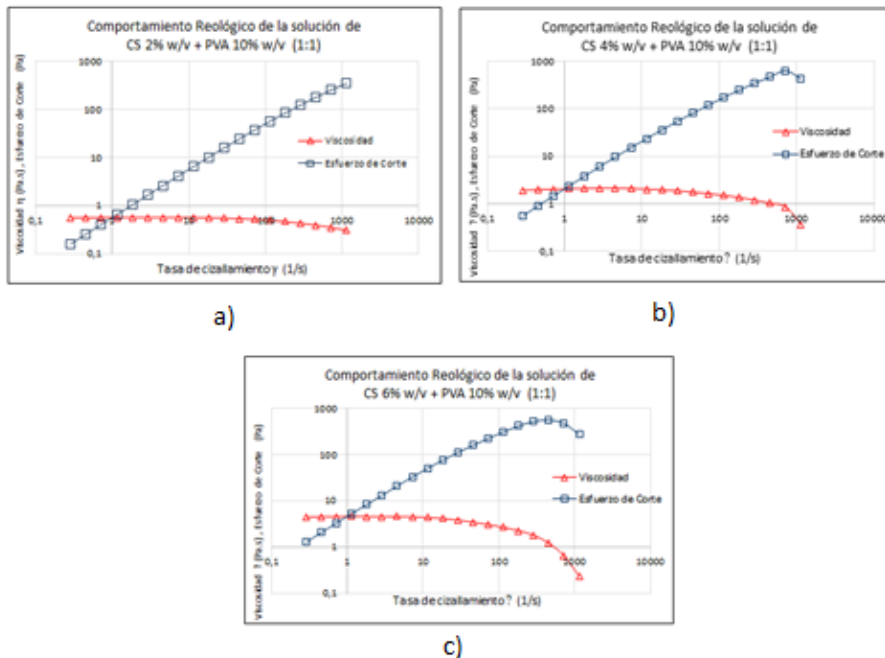


Figura 42. Gráficas esfuerzo de corte vs tasa de cizallamiento (azul) y viscosidad vs tasa de cizallamiento(rojo) de: a) CS 2% w/v, b) CS 4% w/v y c) CS 6% w/v

¹ Todas las soluciones de quitosano están disueltas en ácido acético 70% en agua

4.2.3.2. Graficas comparativas: Viscosidad vs Tasa de cizallamiento

En primer lugar, se procederá a comparar las gráficas viscosidad vs tasa de cizallamiento, de las soluciones de quitosano con variación de concentración de ácido acético, para observar la relación existente entre la viscosidad y la concentración de ácido en la solución. Posteriormente se comparará las gráficas de las soluciones antes mencionadas con la solución acuosa de PVA. Por último se comparará las gráficas de las soluciones que presentaron mejores resultados en el proceso de electrohilado.

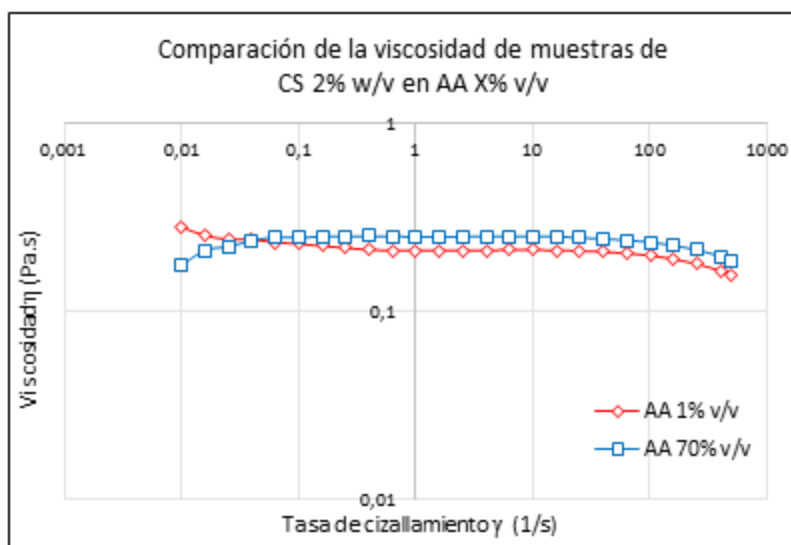


Figura 43. Grafica comparativa entre soluciones de quitosano con variación de concentración de ácido acético.

En la imagen anterior (*Figura 43*), se puede observar lo que se afirmó anteriormente, el aumento de la concentración de ácido acético en la solución incrementa ligeramente su viscosidad, esto coincide con lo propuesto por Geng et al. (2005). A una tasa de cizallamiento de 500 s^{-1} , la viscosidad de la solución de CS 2% w/v en AA 1% v/v es de

157 mPa·s, mientras que la viscosidad de la solución de CS 2% w/v en AA 70% v/v es de 187 mPa·s.

En la *Figura 44* se observa el comportamiento de las soluciones antes ensayadas y de la solución acuosa de PVA (10% w/v). Se puede verificar que la solución acuosa de PVA posee una viscosidad mucho mayor que las soluciones de quitosano en ácido acético, esto explica el porqué del aumento de las viscosidades de las soluciones de quitosano que son mezcladas con PVA.

La viscosidad de la solución acuosa de PVA a una tasa de cizallamiento de 500 s^{-1} es de 672 mPa·s, 4 veces mayor que la solución de CS 2% w/v en AA 1% v/v y 3 veces mayor que la solución de CS 2% w/v en AA 70% v/v.

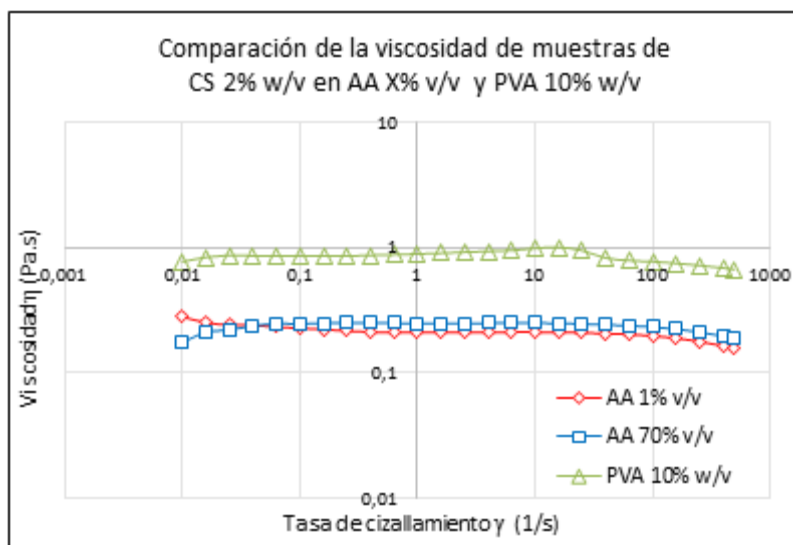


Figura 44. Grafica comparativa entre soluciones de quitosano con variación de concentración de ácido acético y solución de PVA.

Ahora se analizarán las gráficas viscosidad vs tasa de cizallamiento que corresponden a las soluciones de: CS 2% w/v + PVA 10% w/v (1:1), CS 4% w/v + PVA 10% w/v (1:1) y CS 6% w/v + PVA 10% w/v (1:1)²

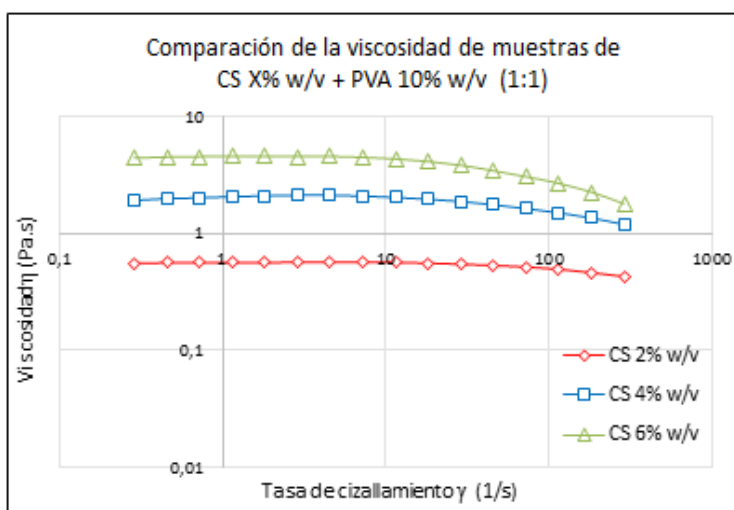


Figura 45. Gráfica comparativa entre soluciones de CS 2% w/v, CS 4% w/v y CS 6% w/v (todas mezcladas con PVA 10% w/v 1:1)

En la *Figura 45*, se observa claramente que la viscosidad de la solución incrementa a medida que se aumenta la concentración de quitosano en ácido acético, esto coincide con lo afirmado por Desbrieres (2002). A una tasa de cizallamiento de 300 s^{-1} , las viscosidades de las soluciones de CS 2% w/v, CS 4% w/v y CS 6% w/v, fueron: 430 mPa·s, 1190 mPa·s y 1800 mPa·s respectivamente.

Sin embargo, según lo observado en las microscopias en el apartado análisis morfológico, a medida que la viscosidad de las soluciones incrementa, el proceso de electrohilado se vuelve cada vez más inestable, es por esta razón que para

² Todas las soluciones de quitosano están disueltas en ácido acético 70% en agua

concentraciones mayores a 6% de quitosano en ácido acético se obtuvieron fibras interconectadas (no homogéneas) y con beads. Por lo que la concentración de quitosano en ácido acético debe ser controlada con precaución con el fin de obtener soluciones con la viscosidad adecuada para el proceso de electrohilado.

4.3. Solubilidad de Sangre de Drago en solución CS/PVA

Con la mejor solución obtenida de CS en AA + PVA, se realizó una serie de combinaciones con solución de sangre de drago (SD), para poder someter la solución resultante al proceso de electrohilado. En una primera fase se mantuvo una relación 1:1 de solución de (CS en AA + PVA) + sangre de drago, utilizando una solución acuosa de sangre de drago a 60% v/v y a 50% v/v. Posteriormente, mediante la plancha de agitación, se procedió a mezclar las soluciones, luego de varios minutos se obtuvo una mezcla grumosa, por lo cual se determinó que con éstas concentraciones de sangre de drago, no se puede obtener una solución final homogénea, tal como se observa en la *Figura 46*.



Figura 46. Solución no homogénea de CS en AA + PVA + SD

En una segunda fase, se realizó el mismo procedimiento con concentraciones de sangre de drago a 40% v/v y a 20% v/v en agua, en las cuales se obtuvieron resultados favorables, debido a que se obtuvo una mezcla homogénea en ambos casos, tal como se observa en la *Figura 47*.



Figura 47. Solución homogénea de CS en AA + PVA + SD

4.4. Membranas de CS en AA + PVA + SANGRE DE DRAGO

4.4.1. Electrohilabilidad

Una vez comprobado las concentraciones a las cuales la solución de sangre de drago es soluble en la solución de CS en AA + PVA, se procedió a realizar el proceso de electrohilado. En la primera fase se realizó dos soluciones, una de 40% v/v y una segunda de 20% v/v de sangre de drago en agua, en relación 1:1 con la solución de

(CS en AA + PVA), como se observa en la *Figura 48*. Se procedió a electrohilar dichas soluciones, teniendo como resultado que la solución no se electrohiló.



Figura 48. Soluciones de CS en AA + PVA + SD a electrohilar

En una segunda fase se realizó dos soluciones, esta vez solo con una concentración de sangre de drago de 40% v/v en agua pero variando las relaciones, la primera que se realizó fue con una relación 1:2, una parte de solución de sangre de drago y dos partes de solución de CS en AA + PVA, esta vez se observó la formación del cono de Taylor pero el proceso era demasiado inestable y no se logró electrohilar a la perfección, por lo que la segunda solución que se realizó fue con 40% v/v de concentración de sangre de drago en agua en una relación 1:3 (una parte de solución de sangre de drago y tres partes de solución de CS en AA + PVA), como lo observamos en la *Figura 49*, con esta

relación se obtuvieron resultados favorables ya que se pudo electrohilar, y obtener una membrana de aspecto prometedor, como se observa en la *Figura 50*.



Figura 49. Soluciones de CS en AA + PVA + SD a electrohilar (segunda fase)



Figura 50. Membrana recolectada de solución de (CS 2% w/v en AA 70% v/v + PVA 10% w/v) + SD 40% v/v (3:1)

4.4.2. Análisis morfológico

- Solución de (CS 2% w/v en Ácido acético 70% v/v + PVA 10% w/v) + SD 40% v/v, relación 3:1

Tabla 20.

Parámetros del proceso (CS 2% en AA 70% + PVA 10%) + SD 40%, 3:1

| Parámetros del proceso | |
|------------------------------|----------|
| Voltaje | 15.8 kV |
| Caudal | 0.5 ml/h |
| Distancia colector – capilar | 12 cm |
| Campo eléctrico | 132 kV/m |

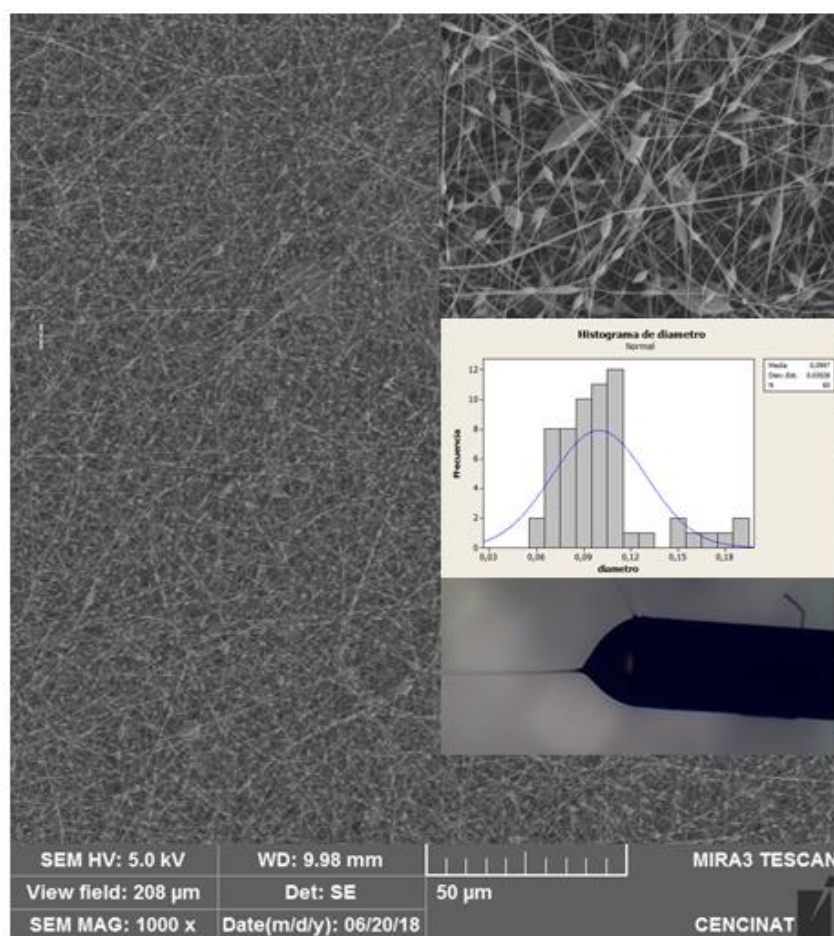


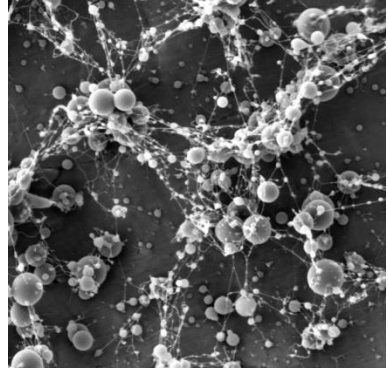
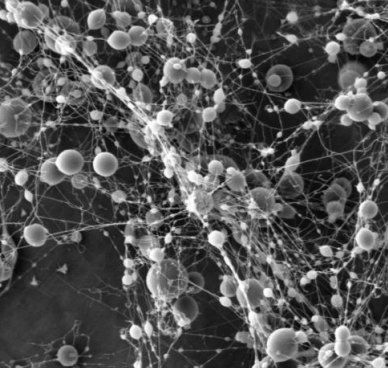
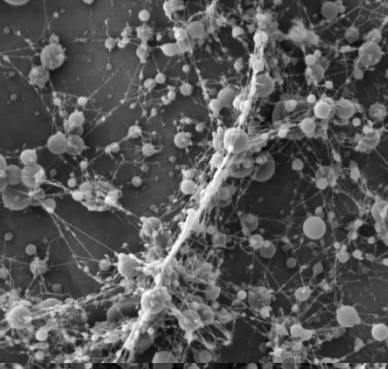
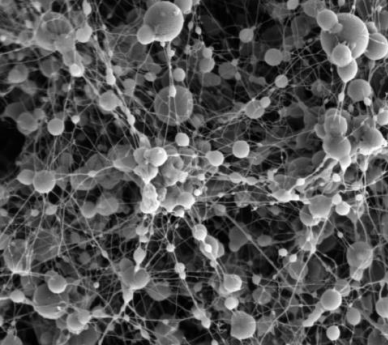
Figura 51. Resultados del proceso [(CS 2% en AA 70% + PVA 10%) + SD 40%, 3:1]

En la *Figura 51* se puede observar que existen fibras no homogéneas (interconectadas) con presencia de beads, a pesar de que el caudal que se utilizó es relativamente elevado en comparación con los caudales implementados para las soluciones sin sangre de drago, no existe la presencia de zonas húmedas en la membrana. El diámetro promedio de las fibras es de 100 ± 30 nm, aproximadamente 134 nm más pequeña que las fibras obtenidas de la misma solución sin mezcla de sangre de drago. Esto sugiere una disminución de la viscosidad de la solución debido a la concentración de sangre de drago.

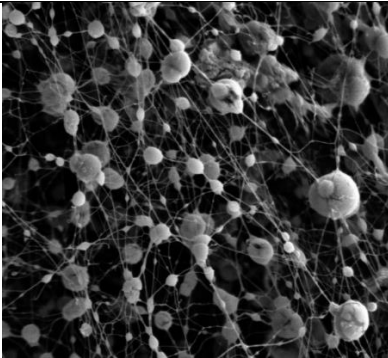

4.5. Membranas con quitosano ecuatoriano

Adicionalmente, se realizaron varias pruebas de electrohilabilidad con quitosano ecuatoriano, el mismo que fue proporcionado en forma de hojuelas (a diferencia del polvo de quitosano utilizado en este estudio). El quitosano ecuatoriano fue adquirido de dos fuentes, y cada uno posee diferente grado de desacetilación. Dr. Juan Lobos de Yachay Tech, proporcionó dos muestras de quitosano con grados de desacetilación de 60% y 70%, mientras que la señorita Josefa Arias de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) proporcionó una muestra de aproximadamente 60% ~ 70% de grado de desacetilación. En la siguiente tabla se expone los resultados de los ensayos realizados, cabe destacar que se utilizaron varias concentraciones de quitosano en ácido acético.

Tabla 21.*Resultados obtenidos con quitosano ecuatoriano*

| Fuente | Parámetros | Diámetro | Microscopía |
|-------------|---|----------|--|
| Yachay Tech | DD: 60% CS2% en AA70% + PVA10% V: 10 kV Q: 0.58 ml/h d: 12 cm | 1030 nm |  |
| Yachay Tech | DD: 60% CS6% en AA70% + PVA10% V: 9.8 kV Q: 0.78 ml/h d: 12cm | 1087 nm |  |
| Yachay Tech | DD: 70% CS2% en AA70%+ PVA10% V: 12.4kV Q: 0.7 ml/h d: 12 cm | 825 nm |  |
| PUCE | DD:80% CS2% en AA70% + PVA10% V: 13.8 kV Q: 0.2 ml/h d: 12 cm | 1083 nm |  |

CONTINÚA

| | |
|---|--|
| <p>PUCE</p> <p>DD:80% CS6% en AA70% + PVA10%</p> <p>V: 11.4 kV Q: 0.5 ml/h d: 12 cm</p> | <p>941 nm</p>  |
| <p>PUCE</p> <p>DD:80% CS10% en AA70% +PVA10%</p> <p>V: 12.8 kV Q: 0.3 ml/h d: 12 cm</p> | <p>N/D</p>  |

Como se puede observar en las microscopias obtenidas en los ensayos (*Tabla 21*), existe una presencia predominante de nanopartículas, con fibras muy escasas, no homogéneas y de diámetro aparentemente muy pequeño (mediciones muy complicadas de realizar), además es muy notoria la existencia de zonas húmedas, lo que sugiere que el caudal de operación es elevado. En las muestras obtenidas con el quitosano de Yachay Tech, se puede realizar dos observaciones, que mientras mayor es el grado de desacetilación (DD), menor es el diámetro de las partículas, y mientras se tenga mayor concentración de quitosano en ácido acético, mayor será el diámetro de las partículas. Por otro lado, en las muestras obtenidas de PUCE se puede observar que el diámetro de las partículas va disminuyendo mientras se utiliza mayor concentración de quitosano en ácido acético. Se observa además en el último ensayo, que no se logró obtener una membrana fibrosa en el colector, en su lugar, se obtuvieron fibras que se formaron al

salir del capilar, esto sugiere en primer lugar, que la viscosidad de la solución es muy elevada, sin embargo la formación de fibras podría ser adecuada mediante la utilización de otro tipo de colector como por ejemplo un colector rotacional cilíndrico o un colector rotacional de disco.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Tras la realización de varios ensayos, se obtuvieron los parámetros óptimos de las soluciones de quitosano que arrojaron resultados favorables tanto en el proceso de electrohilado como en el análisis morfológico. Se determinó que la concentración adecuada de ácido acético (AA) en agua y de PVA en agua, es 70% v/v y 10% w/v respectivamente. En cuanto a la concentración de quitosano (CS) en ácido acético, se pueden emplear valores que van desde 2% w/v hasta 6% w/v. Sin embargo, se debe tener en cuenta que a medida que la concentración de quitosano aumenta, el proceso de electrohilado tiende a volverse inestable y es más probable la aparición de defectos en las fibras submicrométricas.
- En el análisis morfológico de la fibra se realizaron una serie de ensayos variando los parámetros de la solución. Se varió el quitosano desde 2% w/v hasta 10% w/v en ácido acético en un intervalo de 2% de CS, el ácido acético de 50% v/v hasta 70% v/v en un intervalo de 10% de AA en agua, y el PVA de 8% w/v y 10% w/v en agua, dependiendo de cada concentración se utilizaron diferentes parámetros de trabajo que variaron de 0.1 ml/h hasta 0.5 ml/h de caudal y 6 kV hasta 21.3 kV de voltaje. Como resultado de estos ensayos se obtuvo que las fibras con mejor

aparición, es decir, fibras con superficies lisas, homogéneas (continuas), sin presencia de defectos (beads) ni señales de humedad son las que se realizaron con una solución de CS 2% w/v en AA 70% v/v + PVA 10% w/v; estas fibras presentan un diámetro promedio de 220 ± 45 nm, además el rango óptimo de parámetros para trabajar con ésta solución son: caudal de 0.35 ml/h y voltaje que va desde 6kV a 10 kV.

- Se logró caracterizar reológicamente las soluciones necesarias para esta investigación. En primer lugar, se analizaron las muestras de quitosano (al 2% w/v) disueltas en soluciones ácido-acuosas con concentraciones de 1% y 70% v/v en agua, posteriormente se analizó la solución de PVA 10% w/v en agua y finalmente las soluciones que presentaron mejor electrohilabilidad con concentraciones de quitosano de 2%, 4% y 6% w/v (todas disueltas en AA 70% v/v + PVA 10% w/v 1:1). Todas las soluciones presentaron un comportamiento no newtoniano pseudoplástico ya que el esfuerzo de corte no posee una relación lineal con la tasa de cizallamiento y la viscosidad de la solución disminuye a medida que aumenta el parámetro anterior. Se observó que la viscosidad de la solución de quitosano en ácido acético aumenta ligeramente mientras se incrementa la concentración de ácido acético en la solución ácido acético/ agua, a una tasa de cizallamiento de 500 s^{-1} . La viscosidad de las soluciones con AA 1% v/v y 70% v/v fue de 157 mPa·s y 187 mPa·s respectivamente. A su vez la viscosidad de la solución de PVA a la misma tasa de cizallamiento fue de 672

mPa·s, lo que influye en el incremento de la viscosidad y en la electrohilabilidad de las soluciones finales. Además, tras el análisis de las tres muestras restantes se observó que a medida que incrementa la concentración de quitosano en ácido acético la viscosidad de las soluciones también aumenta, a una tasa de cizallamiento de 300 s^{-1} , las viscosidades de las soluciones de CS 2% w/v, CS 4% w/v y CS 6% w/v, fueron: 430 mPa·s, 1190 mPa·s y 1800 mPa·s respectivamente.

- Para poder realizar un análisis comparativo de las soluciones con diferentes concentraciones de quitosano en ácido acético, se utilizó como parámetros constantes PVA al 10% w/v en agua y AA al 70% v/v en agua, variando de esta manera la concentración de quitosano desde 2% w/v hasta 10% w/v con intervalo de 2% de CS en la solución CS/AA, como resultado se obtuvo que la solución con concentración de quitosano del 2% w/v en ácido acético 70% v/v + PVA 10% w/v posee fibras homogéneas, sin presencia de defectos y sin zonas húmedas. Estas fibras poseen un diámetro promedio de $220 \pm 45 \text{ nm}$. La solución con concentración de quitosano de 4% w/v en ácido acético 70% v/v + PVA 10% w/v, no presenta beads y sus fibras son homogéneas y lisas, pero si existen zonas húmedas en la membrana, estas fibras poseen un diámetro promedio de $273 \pm 38 \text{ nm}$. La solución con concentración de quitosano de 6% w/v posee fibras discontinuas ya que existe interconexiones; la apariencia es buena. Sin embargo se observa la presencia de beads (muy pocos), además de que existen varias

zonas húmedas (en mayor cantidad que en las fibras de CS4% w/v en AA70% v/v + PVA 10% w/v). Su diámetro promedio es de 241 ± 56 nm, aunque se observa que el diámetro ha disminuido con respecto a las fibras de CS4% w/v en AA70% v/v + PVA 10% w/v, éste es mayor con respecto a las fibras de CS2% w/v en AA70% v/v + PVA 10% w/v. Esta tendencia creciente se repite en las fibras de concentración CS8% w/v en AA70% v/v + PVA 10% w/v, que poseen un diámetro promedio de 364 ± 57 nm, sin embargo a partir de la concentración CS8% w/v en AA70% v/v + PVA 10% w/v las fibras empiezan a tener mayor presencia de beads, mayor presencia de zonas húmedas y se presentan enmarañadas en las membranas.

5.2. Recomendaciones

- Utilizar un equipo de electrohilado que posea aislamiento, con el fin de minimizar la influencia de parámetros externos al proceso, tales como la temperatura y humedad.
- Realizar estudios con intervalos reducidos (0.5% o 1%), para una mejor determinación de la tendencia del tamaño de las fibras con respecto a la concentración de quitosano, con límites inferior y superior de 1% w/v y 4%w/v.
- Realizar estudios del comportamiento de la solubilidad del quitosano, utilizando otros solventes (ácidos orgánicos), como: TFA, ácido láctico, fórmico, maleico, entre otros.
- Realizar estudios sobre la utilización de sustancias surfactantes como decilsulfonato de sodio para la disminución de la viscosidad de las soluciones de quitosano, con el fin de facilitar la electrohilabilidad de las mismas y el uso de mayor concentración de quitosano, para un mejor aprovechamiento de sus propiedades.
- Profundizar el uso sangre de drago, en solución de quitosano/ácido acético + PVA, con el fin de obtener fibras con mejor morfología.

5.3. Trabajos futuros

- Obtención de fibras de quitosano mediante el proceso de electrohilado, utilizando diferentes tipos de colectores (rotacional cilíndrico, rotacional de disco, mallas, placas paralelas, entre otros).
- Realización de un estudio bacteriológico comparativo entre las membranas de CS + PVA y las membranas de CS + PVA + SD, para su utilización en la fabricación de apósitos.
- Realización de estudios de resistencia mecánica de las membranas nanofibrosas de CS + PVA, para su futura aplicación en filtración (agua o aire).
- Realización de estudios de crecimiento y propagación celular de las membranas de CS + PVA y CS + PVA + SD, para su utilización en ingeniería de tejidos (*tissue scaffolds*).
- Estudios sobre la obtención de películas de CS + PVA y su utilización en vendajes y apósitos.
- Estudios sobre la capacidad adsorbente y floculante de membranas nanofibrosas de CS + PVA y su aplicación en filtración de agua residual.

- Realizar estudios sobre la obtención de quitosano, mediante desacetilación química y enzimática de quitina proveniente de fuentes marinas (exoesqueleto de camarón).

Bibliografía

- Allan, G. G., Altman, L. C., Bensinger, R. E., Ghosh, D. K., Hirabayasi, Y., & Neogi, S. (1984). *Biochemical applications of chitin and chitosan*. En J. P. Zikakis, *Chitin, Chitosan and related enzymes* (págs. 119 - 133). Orlando, Florida, United States: Academic Press.
- Annu, Ahmed, S., & Ikram, S. (2017). *Chitin and Chitosan: History, Composition and Properties*. En *Chitosan Derivatives, Composites and Applications* (págs. 3 - 24). John Wiley & Sons.
- Arbia, W., Arbia, L., Adour, L., & Amrane, A. (2013). *Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods – A Review*. *Food Technol. Biotechnol*, Vol. 51(1), 12 - 25.
- Aules, E., & Quijije, J. (2016). *Caracterización de microfibras de fibroína de seda obtenidos a partir de la técnica de electrohilado*. Sangolquí, Ecuador: UFA-ESPE.
- Balanta, D., Grande, C., & Zuluaga, F. (2010). *Extracción, identificación y caracterización de quitosano del micelio de aspergillus niger y sus aplicaciones como material bioadsorbente en el tratamiento de aguas*. *Iberoamericana de polímeros*, Vol. 11, N° 5, 297 - 316.
- Barra, A., Romero, A., & Beltramino, J. (2012). *Obtención de quitosano*. Santa Cruz, Argentina: Sitio Argentino de Producción Animal.
- Barros, F. C., Grombone, L. C., Vieira, T., & Ferreira, R. (2014). *Removal of Petroleum Spill in Water by Chitin and Chitosan*. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, Vol. 6(1), 70 - 74.
- Baumgarten, P. (1971). *Electrostatic spinning of acrylic microfibers*. *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 36, N° 1, 71 - 79.
- Bhale, S., No, H. K., Prinyawiwatkul, W., Farr, A. J., Nadarajah, K., & Meyers, S. P. (2003). *Chitosan Coating Improves Shelf Life of Eggs*. *Journal of Food Science*, Vol. 68(7), 2378 - 2383.
- Bhargav, P. B., Mohan, V. M., Sharma, A. K., & Rao, V. (2008). *Investigations on electrical properties of (PVA:NaF) polymer electrolytes for electrochemical cell applications*. *Current Applied Physics*, Vol. 9(1), 165 - 171.
- Bhattarai, N., Edmondson, D., Veiseh, O., Matsen, F., & Zhang, M. (2005). *Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility*. *Biomaterials*, Vol. 26, 6176 - 6184.
- Cámara Nacional de Acuicultura. (2018). *Exportaciones de camarón ecuatoriano: % por mercado*. Obtenido de: <https://www.cna-ecuador.com/mayo-2018/>
- Chen, W. R., Adams, R. L., Carubelli, R., & Nordquist, R. E. (1997). *Laser-photosensitizer assisted immunotherapy: A novel modality for cancer treatment*. *Cancer Lett.*, Vol. 115, 25 - 30.

- Condo Curipallo, A. M. (2014). *Estudio in vitro de las propiedades antibacterianas del Croton lechleri (sangre de drago) como medicamento alternativo preventivo en la proliferación de bacterias existentes en cavidad después de una extracción dental*. Ambato, Ecuador: UTA.
- Crestini, C., Kovac, B., & Giovannozzi, G. (1996). *Production and Isolation of Chitosan by Submerged and Solid-state Fermentation from Lentinus edodes*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 50, 207 - 210.
- Cunha, T., Teixeira, B., Santos, B., Almeida, M., Dias, G., & das Neves, J. (2012). *Biological and Pharmacological Activity of Chitosan and Derivatives*. En *Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics* (págs. 76 - 92). John Wiley & Sons.
- Dass, C. R., & Choong, P. F. (2008). *The use of chitosan formulations in cancer therapy*. *J. Microencapsul.*, Vol. 25, 275 - 279.
- Deitzel, J., Kleinmeyer, J., Harris, D., & Beck Tan, N. (2001). *The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles*. Estados Unidos .
- Desbrieres, J. (2002). *Viscosity of Semiflexible Chitosan Solutions: Influence of Concentration, Temperature, and Role of Intermolecular Interactions*. *Biomacromolecules*, Vol. 3(2), 342 - 349.
- Desmarchelier, C., Witting Schaus, F., Coussio, J., & Cicca, G. (1997). *Effects of sangre de drago from Croton lechleri Muell-Arg. on the production of active oxygen radicals*. Buenos Aires, Argentina.
- Doshi, J., & Reneker, D. (1995). *Electrospinning process and applications of electrospun fibers*. Ohio, Estados Unidos.
- Duque Sánchez, L. M., Rodriguez, L., & López, M. (2013). *Electrospinning: La era de las nanofibras*. Santander, Colombia.
- Dutta, P., Dutta, J., & Tripathi, V. (2004). *Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications*. *Journal of Scientific & Industrial Research*, Vol. 63, 20 - 31.
- Estévez, G., Flores, R., & Novillo, F. (2013). *Extracción de quitina a partir de pluma de calamar (Ioligo spp.) por un método ecológico mediante la aplicación de aceite vegetal saponificado*. *Química Central*, Vol. 03, N° 02: 25 - 31.
- Fernandez-Saiz, P., Ocio, M. J., & Lagaron, J. M. (2010). *The use of chitosan in antimicrobial films for food protection*. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, Vol. 5(24).
- FLACSO-MIPRO. (2011). *Boletín mensual de análisis sectorial de MIPYMES, Procesamiento de camarón para exportación (R6 y R2)*. Obtenido de:

<https://www.flacso.edu.ec/portal/pnTemp/PageMaster/v1h0ohbg78sb6mncmkk5w3mwji4ep.pdf>

- Gallaher, C. M., Munion, J., Hesslink, R., Wise, J., & Gallaher, D. D. (2000). *Cholesterol Reduction by Glucomannan and Chitosan Is Mediated by Changes in Cholesterol Absorption and Bile Acid and Fat Excretion in Rats*. *The Journal of Nutrition*, Vol. 130(11), 2753–2759.
- García, N. (2013). *Electrospinning: una técnica fascinante para la obtención de nanofibras poliméricas*. *Plásticos modernos*, Vol. 105(677), 166 - 173.
- Geng, X., Kwon, O.-H., & Jang, J. (2005). *Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution*. *Biomaterials*, Vol. 26, 5427–5432.
- Gopal, R., Kaur, S., Ma, Z., Chan, C., Ramakrishna, S., & Matsuura, T. (2006). *Electrospun nanofibrous filtration membrane*. Canada.
- Guan, Y. J., Hu, J., Wang, X. J., & Shao, C. X. (2009). *Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress*. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, Vol. 10(6), 427 - 433.
- Guilbert, S., Gontard, N., & Cuq, B. (1995). *Technology and Applications of Edible Protective Films*. *Packaging Technology and Science*, Vol. 8, 339 - 346.
- Harding, S. E., Tombs, M. P., Adams, G. G., Paulsen, B. S., Inngjerdingen, K. T., & Barsett, H. (2017). *An introduction to polysaccharide biotechnology* (Second ed.). New York: Taylor & Francis.
- Herring. (1979). *Marine ecology and natural products*. *Pure appl, chem*. 51: 1901-1911.
- Horzum, N., Boyacı, E., Eroglu, A., Shahwan, T., & Demir, M. (2010). *Sorption Efficiency of Chitosan Nanofibers toward Metal Ions at Low Concentrations*. *Biomacromolecules*, Vol. 11(12), 3301 - 3308.
- Huang, Z. M., Zhang, Y., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2003). *A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites*. *Composites Science and Technology*, Vol. 63, 2223 - 2253.
- Ifuku, S., Nomura, R., Morimoto, M., & Saimoto, H. (2011). *Preparation of chitin nanofibers from mushrooms*. *Materials*, Vol.4, 1417 - 1425.
- Illum, L. (1998). *Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient*. *Pharmaceutical Research*, Vol. 15(9), 1326 - 1331.
- Jacobs, V., Patanaik, A., Anandjiwala, R., & Maaza, M. (2011). *Optimization of Electrospinning Parameters for Chitosan Nanofibres*. *Current Nanoscience*, Vol. 7, 396 - 401.

- Janes, K. A., Calvo, P., & Alonso, M. J. (2001). *Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 47, 83–97.
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Sudheesh Kumar, P., Nair, S., & Tamura, H. (2011). *Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications*. India.
- Jeon, C., & Höll, W. H. (2003). *Chemical modification of chitosan and equilibrium study for mercury ion removal*. *Water Research*, Vol. 37, 47 - 70.
- Jeon, Y. J., & Kim, S. K. (2002). *Antitumor activity of chitosan oligosaccharides produced in an ultra filtration membrane reactor system*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 12, 503 - 507.
- Jiang, S., Liu, S., & Feng, W. (2011). *PVA hydrogel properties for biomedical application*. China.
- Jianglian, D., & Shaoying, Z. (2013). *Application of Chitosan Based Coating in Fruit and Vegetable Preservation: A Review*. *Food Processing and Technology*, Vol. 4(5), 1 - 4.
- Jin, H. J., Fridrikh, S. V., Rutledge, G. C., & Kaplan, D. L. (2002). *Electrospinning Bombyx mori silk with poly (ethylene oxide)*. Estados Unidos.
- Jones, K. (2003). *Review of sangre de drago (Croton lechleri)- A South American tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: traditional uses to clinical research*.
- Kean, T., & Thanou, M. (2011). *Chitin and Chitosan: Sources, Production and Medical Applications*. En P. Williams (Ed.), *Renewable Resources for Functional Polymers and Biomaterials* (págs. 292 - 318). Royal Society of Chemistry.
- Kean, T., & Thanou, M. (2010). *Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan*. *Adv. Drug Deliver*, 3 - 11.
- Kean, T., & Thanou, M. (2012). *Toxicological Properties of Chitosan and Derivatives for Biopharmaceutical Applications*. En *Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics* (págs. 453 - 461). John Wiley & Sons.
- Keong, L. C., & Halim, A. S. (2009). *In Vitro Models in Biocompatibility Assessment for Biomedical-Grade Chitosan Derivatives in Wound Management*. *Int. J. Mol. Sci*, Vol. 10, 1300 - 1313.
- Kim, J. S., & Reneker, D. H. (s.f.). *Mechanical properties of composites using ultrafine electrospun fibers*. Ohio, Estados Unidos.
- Kim, S.-K. (2011). *Chitin, Chitosan oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications*. New York: Taylor & Francis.

- Kong, M., Chen, X. G., Liu, C. S., Liu, C. G., Meng, X. H., & Yu, L. J. (2008). *Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against E. coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 65, 197 - 202.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review*. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 144, 51 - 63.
- Koski, A., Yim, K., & Shivhumar, S. (2003). *Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning*. Estados Unidos.
- Lalaleo, L. (2010). *Desarrollo de un método para la obtención de quitosano a partir de caparazones de camarón (Penaeus Vannamei), utilizando un agente reductor químico*. Ambato, Ecuador: UTA.
- Larrondo, L., & Manley, J. (s.f.). *Electrostatic fiber spinning from polymer melts. I. Experimental observations on fiber formation and properties*. Canda.
- Lee, C. K., Kim, S. I., & Kim, S. J. (2005). *The Influence of added ionic salt on nanofiber uniformity for electrospinning of electrolyte polymer*. Seoul, Korea.
- Lee, J., Choi, K. H., Ghim, H. D., Kim, S. S., Chun, D. H., Kim, H. Y., & Lyoo, W. S. (2004). *Role of molecular weight of atactic poly (vinyl alcohol) (PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning*. Korea.
- Leuba, S., & Stossel, P. (1985). *Chitosan and other polyamines: Antifungal activity and interaction with biological membranes*. En R. A. Muzzarelli, C. Jeuniaux, & C. Gooday, *Chitin in Nature and Technology* (pág. 217). New York: Plenum Press.
- Li, Q., & Kegley, L. (2004). *Chitosan: Its formation, properties and applications*. Salem, Oregon, United States: Oregon State University.
- Li, Q., Dunn, E. T., Grandmaison, E. W., & Goosen, M. F. (1992). *Applications and Properties of Chitosan*. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, Vol. 7, 370 - 397.
- Li, Z., & Wang, C. (2013). *One-Dimensional nanostructures Electrospinning technique and unique nanofibers*. New York: Springer.
- Lu, J. X., Prudhommeaux, F., Meunier, A., Sedel, L., & Guillemin, G. (1999). *Effects of chitosan on rat knee cartilages*. *Biomaterials*, Vol. 20, 1937 - 1944.
- Luna, Y. (2012). *Obtención de quitosano a partir de quitina para su empleo en conservación de frutillas y moras*. Quito, Ecuador: UCE.
- Maezaki, Y., Tsuji, K., Nakagawa, Y., Kawai, Y., Akimoto, M., Tsugita, T., . . . Mitsuoka, T. (1993). *Hypocholesterolemic Effect of Chitosan in Adult Males*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, Vol. 57, 1439 - 1444.

- Maragatham, C., Panneerselvam, A., & Subbu, K. (2016). *Extraction, Optimization and Characterization of Chitosan from Penicillium chrysogenum*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, Special Issue-3: 19 - 26.
- Mármol, Z., Gutiérrez, E., Páez, G., Ferrer, J., & Rincón, M. (2004). *Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón*. Multiciencias, Vol. 4, N° 2: 1 - 10.
- Martin, G. P. (1995). *Applications and environmental aspects of chitin and chitosan*. Journal of macromolecular science, Part A: Pure and Applied Chemistry, 32:4, 629-640.
- Mathur, N. K., & Narang, C. K. (1990). *Chitin and Chitosan, Versatile Polysaccharides from Marine Animals*. Journal of Chemical Education, Vol. 67(11), 938 - 942.
- Megelski, S., Stephens, J., Chase, B., & Rabolt, J. F. (2002). *Micro-and Nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers*. Delaware, Estados Unidos.
- Melo, J. (2018). *Obtención de fibras submicrométricas de fibroína de seda con sangre de drago (croton lechleri müll) para aplicaciones biomedicas a través de la técnica de electrohilado*. Sangolquí, Ecuador: UFA-ESPE.
- Miaudet, P., Bartholome, C., Derré, A., Maugey, M., Sigaud, G., Zakri, C., & Poulin, P. (2007). *Thermo-electrical properties of PVA-nanotube composite fibers*. Francia.
- Minami, S., Okamoto, Y., Tanioka, S., Sashiwa, H., Saiomoto, H., Matsuhashi, A., & Shigemasa, Y. (1993). *Effects of chitosan on wound healing*. En M. Yalpani, *Carbohydrates and carbohydrate polymers Frontiers in biomedicine and biotechnology* (págs. 141 - 152). Mount Prospect: ATL Press.
- Ministerio de Comercio Exterior e Inversiones. (2017). *Camarones, Langostinos y demás Decápodos*. Obtenido de: <https://www.comercioexterior.gob.ec/wp-content/uploads/2018/04/Camarones-Langostinos-y-dem%C3%A1s-dec%C3%A1podos.pdf>
- Miranda, S., & Lizárraga, E. (2012). *Is chitosan a new panacea? areas of applications*. México.
- Murata, J., Saiki, I., Nishimura, S., Nishi, N., Tokura, S., & Azuma, I. (1989). *Inhibitory effect of chitin heparinoids on the lung metastasis of B16-BL6 melanoma*. Jpn. J. Cancer Res., Vol. 80, 866 - 872.
- Muzzarelli, R. (1977). *Chitin*. Oxford: Pergamon Press.
- Muzzarelli, R. A., & Muzzarelli, C. (2006). *Chitosan, a dietary supplement and a food technology commodity*. En C. G. Biliaderis, & M. S. Izydorczyk, *Functional Food Carbohydrates* (págs. 215 - 248). Orlando, Florida, United States: Francis & Taylor.
- Nemtsev, S. V., Gamzazade, A. I., Rogoshin, S. V., Bykova, V. M., & Bykov, V. P. (2002). *Deacetylation of chitin under homogeneous conditions*. Applied Biochemistry and Microbiology, Vol. 38(6), 521 - 526.

- Nirmala, R., Navamathavan, R., Kang, H.-S., El-Newehy, M., & Kim, H. Y. (2011). *Preparation of polyamide-6/chitosan composite nanofibers by a single solvent system via electrospinning for biomedical applications*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 83(ISSN: 0927-7765), 173 - 178.
- Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Saiki, I., Tokura, S., & Azuma, I. (1984). *Immunological activity of chitin and its derivatives*. *Vaccine*, Vol. 2, 93 - 99.
- Ohkawa, K., Cha, D., Kim, H., Nishida, A., & Yamamoto, H. (2004). *Electrospinning of Chitosan*. *Macromolecular Rapid Communications*, Vol. 25, 1600 - 1605.
- Okamoto, Y., Kawakami, K., Miyatake, K., Morimoto, M., Shigemasa, Y., & Minami, S. (2002). *Analgesic effects of chitin and chitosan*. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 49, 249 - 252.
- Okamoto, Y., Yano, R., Miyatake, K., Tomohiro, I., Shigemasa, Y., & Minami, S. (2003). *Effects of chitin and chitosan on blood coagulation*. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 53, 337 - 342.
- Onsoyen, E., & Skaugrud, O. (1990). *Metal Recovery Using Chitosan*. *J. Chem. Tech. Biotechnol*, Vol. 49, 395 - 404.
- Pacheco, N. (2010). *Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: caracterización y aplicación*. Lyon, Francia: UCB.
- Park, I. K., Lee, Y. K., Kim, M. J., & Kim, S. D. (2002). *Effect of surface treatment with chitooligosaccharide on shelf-life of baguette*. *Journal of Chitin and Chitosan*, Vol. 7, 214 - 218.
- Parvez, S., Rahman, M. M., Khan, M. A., Khan, M. H., Islam, J. M., Ahmed, M., . . . Ahmed, B. (2012). *Preparation and characterization of artificial skin using chitosan and gelatin composites for potential biomedical application*. *Polymer Bulletin*, Vol. 69, 715 - 731.
- Pereira, U., Garcia Le Gal, C., Le Gal, G., Boulais, N., Lebonvallet, N., Dorange, G., . . . Misery, L. (2010). *Effects of sangre de drago in an in vitro model of cutaneous neurogenic inflammation*. Francia.
- Petrik, S., & Maly, M. (2010). *Production nozzle-less electrospinning nanofiber technology*.
- Pillai, C., Paul, W., & Sharma, C. (2009). *Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation*. *Progress in Polymer Science*, Vol. 34, 641 - 678.
- Pluas, J., & Veliz, W. (2017). *Estudio de la obtención de quitosano a partir de caparazón de cangrejo rojo (ucides occidentalis)*. Guayaquil, Ecuador: Universidad de Guayaquil.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). *Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action*. *Biomacromolecules*, Vol. 4(6), 1457 - 1465.
- Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.-E., Lim, T.-C., & Ma, Z. (2005). *An introduction to electrospinning and nanofibers*. Singapore: World Scientific.

- Ramyadevi, D., Subathira, A., & Saravanan, S. (2012). *Potential Recovery of Protein from Shrimp Waste in Aqueous two Phase System*. Research Journal of Chemical Sciences, Vol. 2(7), 47 - 52.
- Rane, K. D., & Hoover, D. G. (1992). *An Evaluation of Alkali and Acid Treatments for Chitosan Extraction from Fungi*. Process Biochemistry(28), 115 - 118.
- Rane, K. D., & Hoover, D. G. (1993). *Production of Chitosan by Fungi*. Food Biotechnology, Vol. 7(1), 11 - 33.
- Ravi Kumar, M. (2000). *A review of chitin and chitosan applications*. Reactive & Functional Polymers, Vol. 46, 1 - 27.
- Rigby, G. W. (1934). *Patente nº U.S. Patent 2,040,879*.
- Rinaudo, M. (2006). *Chitin and chitosan: Properties and applications*. Progress in Polymer Science(31), 603 - 632.
- Risco, E., Ghia, F., Vila, R., Iglesias, J., Álvarez, E., & Cañigueral, S. (2003). *Immunomodulatory activity and chemical characterisation of sangre de drago (dragon's blood) from croton lechleri*. Buenos Aires, Argentina.
- Risco, E., Vila, R., Henriques, A., & Cañigueral, S. (2005). *Bases químicas y farmacológicas de la utilización de la sangre de drago*. España.
- Romanazzi, G., Gabler, F., Margosan, D., Mackey, B., & Smilanick, J. (2009). *Effect of Chitosan Dissolved in Different Acids on Its Ability to Control Postharvest Gray Mold of Table Grape*. Postharvest Pathology and Mycotoxins, Vol. 99(9), 1028 - 1036.
- Rosic, R., Pelipenki, J., Kocbek, P., Baumgartner, S., Bester Rogac, M., & Kristl, J. (2012). *The role of rheology of polymer solutions in predicting nanofiber formation by electrospinning*. Slovenia.
- Sannan, T., Kurita, K., & Iwakura, Y. (1976). *Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility*. Makromol. Chem.(177), 3589 - 3600.
- Schipper, N. G., Varum, K. M., & Artursson, P. (1996). *Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells*. Pharmaceutical Research, Vol. 13(11), 1686 - 1692.
- Shin, Y., Hohman, M., Brenner, M., & Rutledge, G. (2000). *Electrospinning: A whipping fluid jet generates submicron polymer fibers*. Estados Unidos.
- Sill, T., & Von Recum, H. (2008). *Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering*. Estados Unidos.

- Solano, J. (2017). *Obtención de quitosano a partir del exoesqueleto del camarón (infraorden caridea)*. Machala, Ecuador: UTMACH.
- Soro, L. (2007). *Estudio de la obtención de quitosano a partir de caparazón de camarón (Penaeus Vannamei) y su aplicación en la estabilidad de una emulsión aceite en agua*. Guayaquil, Ecuador: ESPOLE.
- Stammen, J. A., Williams, S., Ku, D. N., & Guldborg, R. E. (2000). *Mechanical properties of a novel PVA hydrogel in shear and unconfined compression*. Estados Unidos.
- Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., & Knorr, D. (1992). *Antibacterial action of chitosan*. *Food Biotechnology*, Vol. 6, 257 - 272.
- Suh, F. J., & Matthew, H. W. (2000). *Applications of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: A review*. *Biomater.*, Vol. 21, 2589 - 2598.
- Taylor, G. (1969). *Electrically driven jets*.
- Tsai, P., Schreuder Gibson, H., & Gibson, P. (2001). *Different electrostatic methods for making electret filters*. Estados Unidos.
- Tsaih, M., & Chen, R. (2003). *The Effect of Reaction Time and Temperature During Heterogenous Alkali Deacetylation on Degree of Deacetylation and Molecular Weight of Resulting Chitosan*. *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 88, 2917 - 2923.
- Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D., & Bouriotis, V. (2000). *Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology*. *Trends Biotechnol*, Vol. 18, 305 - 312.
- Wang, X., Cheng, F., Gao, J., & Wang, L. (2014). *Antibacterial wound dressing from chitosan/polyethylene oxide nanofibers mats embedded with silver nanoparticles*. *Journal of biomaterials applications*.
- Wedmore, I., McManus, J., Pusateri, A., & Holcomb, J. (2006). *A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: Experience in current combat operations*. *The Journal of Trauma*, Vol. 60(3), 655 - 658.
- Yang, Y. M., Hu, W., Wang, X. D., & Gu, X. S. (2007). *The controlling biodegradation of chitosan fibers by n-acetylation in vitro and in vivo*. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 18, 2117 - 2121.
- Yin, A., Zhang, K., McClure, M., Huang, C., Wu, J., Fang, J., . . . El-Newehy, M. (2013). *Electrospinning collagen/chitosan/poly(L-lactic acid-co-ε-caprolactone) to form a vascular graft: Mechanical and biological characterization*. *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 101 A(5), 1292 - 1301.
- Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). *Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications*. *Marine drugs*(13), 1133 - 1174.

Zhou, Y. G., Yang, Y. D., Qi, Y. G., Zhang, Z. M., Wang, X. J., & Hu, X. J. (2002). *Effects of chitosan on some physiological activity in germinating seed of peanut*. Journal of Peanut Science, Vol. 31, 22 - 25.

Zikakis, J. P., Saylor, W. W., & Austin, P. R. (1982). *Chitin and Chitosan*. The Japanese Society of Chitin and Chitosan, 233.