



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

ÁREA TEMÁTICA EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**ACTIVIDAD DEL ÁCIDO CARMÍNICO EN MATRICES DE
CELULOSA: ESTUDIO DIRIGIDO A SU USO COMO
SENSOR INTELIGENTE**

Tesis que presenta:

I.B.Q. ALIA NOHEMÍ YHAMEL GARCÍA

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Director de tesis: D.C. Nelly Flores Ramírez

Morelia, Mich.

Agosto 2011

RESUMEN

“Actividad del ácido carmínico en matrices de celulosa: estudio dirigido a su uso como sensor inteligente”

Por:

Alia Nohemí Yhamel García

Julio de 2011

Maestra en Ciencias Biológicas

Director de tesis: D.C. Nelly Flores Ramírez

Dentro de los materiales más usados en el envasado y como dispositivos de seguridad en los alimentos se encuentran los biopolímeros ya que reúnen propiedades muy atractivas y se emplean como recubrimientos o parte de sistemas activos. La inherente especificidad, selectividad y adaptabilidad de los biosensores los hacen candidatos ideales para su uso en la industria alimentaria. Los biosensores están directamente relacionados con la calidad del producto y ofrecen mejoras en la prevención de riesgos alimentarios. Por la importancia que implica la seguridad alimentaria, ésta investigación contempla el desarrollo de películas y nanopartículas de celulosa, integrando en estas matrices el ácido carmínico (AC) que podrá actuar como un indicador de seguridad en alimentos envasados, además se analizó la factibilidad de las matrices para soportar al AC. Las películas se obtuvieron por disolución ácida y acuosa, mientras que las nanopartículas utilizando el método de emulsión inversa. Una vez obtenidas las matrices se integró el ácido carmínico por dos métodos: a) *In situ* e b) Inmersión, manejando 4 concentraciones. Los materiales obtenidos se caracterizaron por análisis espectroscópicos y microscópicos. Se obtuvieron películas con 2 tamaños de fibra, y nanopartículas de tamaño nanométrico, con un rendimiento del 83.92%. Los resultados muestran que las matrices presentan características deseables para alojar al AC. Comparando los procesos de integración del AC, el método *In situ*, permitió una integración del AC a las tres matrices de una forma homogénea, y con una mayor intensidad a la concentración de 0.5wt%. Mediante Microscopía electrónica de barrido (SEM) se visualizó en las películas por disolución ácida, fibras de tamaño más corto, a

diferencia de las obtenidas por disolución acuosa donde las fibras son más largas y rugosas; corroborándose que los sistemas en disolución ácida promueven la ruptura de las fibras generando mayor área de contacto y por lo tanto integración del AC. En lo que respecta a las nanopartículas, el AC favorece la formación de aglomerados conforme aumenta la concentración. Los resultados por FTIR para las películas integrando el AC *In situ* mostraron un ligero desplazamiento del grupo OH, indicando enlaces intermoleculares entre la celulosa y el AC. En las nanopartículas por inmersión muestran que existe mayor interacción intramolecular a la concentración de 0.5wt%, a diferencia del método *In situ*, en el cual la intensidad de las señales es acorde a las concentraciones, indicando que existe menor interacción intramolecular y quedando el AC con mayores posibilidades de reacción ante un agente externo.

Por simulación molecular se pudo explicar el comportamiento e interacción molecular del sistema AC–Celulosa. Este sistema también se evaluó por UV-VIS bajo condiciones de temperatura y humedad, las cuales favorecieron la disgregación e incremento de la intensidad de color del AC.

ABSTRACT

“Carminic acid activity in cellulose matrix: study oriented to use as intelligent sensor”

By:

Alia Nohemí Yhamel García

July 2011

Master in Biological Sciences

Advisor: Ph.D. Nelly Flores Ramírez

Among the materials used in packaging and as safety devices foods, biopolymers have very attractive properties and are used as food coatings or parts of active systems. The inherent specificity, selectivity and adaptability of biosensors make them ideal candidates for use throughout the food industry. Biosensors are directly related to product quality and offer improvements in the prevention of food hazards. Due the importance of food security, in this research cellulose films and nanoparticles with carminic acid integrated were developed, in order to they may act as a safety indicator in packaged foods.

The films were obtained by aqueous and acidic solution, while nanoparticles using the inverse emulsion. Carminic acid was integrated by two methods: a) *In situ* and b) Immersion, with 4 concentrations. Materials were characterized by spectroscopic and microscopic techniques. Films were obtained with 2 fiber sizes, nanoparticles nano-sized, with a yield of 83.92%. The results show that the matrices have desirable features to integrate the CA. Comparing the CA integration methods, In situ method allowed an integration of the three matrices CA in a homogeneous way, and with greater intensity to the concentration of 0.5% wt. Through SEM was visualized in the acidic solution films, shorter fiber size, unlike those obtained by aqueous solution where the fibers are longer and rough, corroborating that the systems in acidic solution promotes the fibers breakdown generating more contact area and thus integration of the CA. In nanoparticles, agglomerates were observed proportionality to CA amount. FTIR results for the films In situ integrating CA showed a slight shift of the OH group, indicating intermolecular bonds between

cellulose and the CA. In nanoparticles immersion method shows that there is more intramolecular interaction with 0.5 wt% concentration, unlike the in situ method in which the signal strength is according to concentrations, indicating that there is less intramolecular interaction and CA may react to an external agent. Molecular simulation was performed, and could be explained the behavior and molecular interaction of CA-cellulose system. This system was also evaluated by UV-Vis under temperature and humidity conditions, which promoted the disintegration and increased color intensity of CA.

CONTENIDO

Resumen	ii
Abstract	iv
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Nomenclatura	xv
Agradecimientos	xvii
Glosario	xix

Capítulo I. Introducción

1.1	Objetivos	3
1.2	Hipótesis	4

Capítulo II. Marco teórico

2.1	Polímeros naturales	5
2.2	Celulosa	6
2.2.1	Estructura molecular	7
2.2.2	Arreglo microscópico	8
2.2.3	Solubilidad	9
2.2.4	Usos y aplicaciones	9
2.3	Ácido carmínico	11
2.3.1	Estructura molecular	12
2.3.2	Color y pH	13
2.3.3	Estabilidad	13
2.3.4	Solubilidad	14
2.3.5	Usos y aplicaciones	14
2.4	Envases inteligentes	15
2.4.1	Sensores indicadores mediante cambios visuales observables	17
2.4.2	Aplicaciones	18

2.4.3	Biosensores	19
2.5	Nanotecnología	20
2.5.1	Polímeros en la nanotecnología	20
2.5.2	Aplicaciones	21
2.6	Métodos de caracterización	22
2.6.1	Microscopía de fuerza atómica (AFM)	23
2.6.2	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	23
2.6.3	Espectroscopía infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)	24
2.6.4	Espectroscopía UV-Vis	26
2.7	Simulación molecular	26
Capítulo III. Metodología		
3.1	Reactivos	28
3.2	Obtención de películas de celulosa	29
3.3	Obtención de nanopartículas de celulosa (Nano)	32
3.4	Integración del ácido carmínico (AC) a las matrices de celulosa	33
3.4.1	Películas de celulosa y AC (Cel/AC)	33
3.4.2	Nanopartículas de celulosa y AC (Nano/AC)	36
3.5	Evaluación de la actividad del AC ante condiciones variables de humedad y temperatura	37
3.6	Técnicas de caracterización	38
3.6.1	Rendimiento de nanopartículas	38
3.6.2	Determinación de color	38
3.6.3	Microscopía de fuerza atómica (AFM)	39
3.6.4	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	39
3.6.5	Espectroscopía infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)	40
3.6.6	Espectroscopía UV-Vis	40
3.7	Simulación molecular de celulosa y AC	41

Capítulo IV. Resultados y Discusiones

4.1	Obtención de películas de celulosa	42
4.2	Obtención de nanopartículas de celulosa (Nano)	46
4.3	Integración del ácido carmínico (AC) a las matrices de celulosa	46
4.3.1	Películas de celulosa y AC (Cel/AC)	46
4.3.2	Nanopartículas de celulosa y AC (Nano/AC)	55
4.4	Caracterización de muestras	58
4.4.1	Rendimiento de nanopartículas	58
4.4.2	Determinación de color	58
4.4.3	Microscopía de fuerza atómica (AFM)	59
4.4.4	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	62
4.4.5	Espectroscopía infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)	73
4.4.6	Evaluación del sistema AC-Cel ante condiciones variables de humedad y temperatura.	88
4.5	Simulación molecular de celulosa y AC	90

Capítulo V. Conclusiones	100
---------------------------------	------------

Bibliografía	102
---------------------	------------

LISTA DE TABLAS

Tabla 3.1	Concentración de celulosa y tiempo para la formación de películas en solución ácida.	30
Tabla 3.2	Concentración de celulosa y tiempo de disolución para la formación de películas en solución acuosa.	31
Tabla 4.1	Características de las películas obtenidas por disolución ácida.	41
Tabla 4.2	Características de las películas obtenidas por disolución ácida.	44
Tabla 4.3	Condiciones de obtención de películas por disolución ácida y acuosa con las mejores características.	45
Tabla 4.4	Películas disolución ácida + AC Inmersión.	46
Tabla 4.5	Películas disolución acuosa + AC Inmersión.	48
Tabla 4.6	Películas disolución ácida + AC <i>In situ</i> .	50
Tabla 4.7	Películas disolución acuosa + AC <i>In situ</i> .	52
Tabla 4.8	Nanopartículas + AC Inmersión	54
Tabla 4.9	Nanopartículas + AC <i>In situ</i>	55
Tabla 4.10	Luminosidad de las matrices de celulosa en estado puro y una vez integrado el AC.	58
Tabla 4.11	Bandas de absorción por FTIR características para el AC.	73
Tabla 4.12	Bandas de absorción por FTIR características para la celulosa.	76
Tabla 4.13	Luminosidad de las matrices de celulosa Cel/ac/ACIs 0.5wt%, Cel/acu/ACIs 0.5wt% y Nano/ACIs 0.5wt%, sometidas a diferentes condiciones de humedad y temperatura.	88

LISTA DE FIGURAS

Fig. 2.1	Unidad de repetición de la celulosa (celobiosa)	7
Fig. 2.2	Celulosa	8
Fig. 2.3	Estructura del ácido carmínico	12
Fig. 2.4	Insectos de cochinilla hembra: a) Vista superficial sobre planta de nopal, b) Cuerpo de la hembra goteando ácido carmínico	13
Fig. 3.1	Celulosa de Eucalyptus saligna	28
Fig. 3.2	Estructura del Ácido carmínico	28
Fig. 3.3	Disolución ácida de celulosa	29
Fig. 3.4	Disolución acuosa de celulosa	31
Fig. 3.5	Método de emulsion inversa	32
Fig. 3.6	Integración por inmersión de las películas de celulosa	33
Fig. 3.7	Integración in situ disolución ácida	34
Fig. 3.8	Integración in situ disolución acuosa	34
Fig. 3.9	Integración por inmersión del AC a las nanopartículas (Nano/ACIm)	35
Fig. 3.10	Integración in situ del AC a las nanopartículas de celulosa (Nano/ACIs)	36
Fig. 3.11	Colorímetro Hunter Lab	37
Fig. 3.12	Microscopio de Fuerza Atómica	38
Fig. 3.13	Microscopio Electrónico de Barrido	38
Fig. 3.14	Espectroscopio Infrarrojo por Transformada de Fourier	39
Fig. 3.15	Espectroscopio UV-vis Lambda 40	39
Fig. 4.1	Película de celulosa con 0.3wt% de celulosa y 24 hrs disolución	41
Fig. 4.2	Película de celulosa con 0.6wt% de celulosa y 24 hrs disolución	41

Fig. 4.3	Película de celulosa con 0.7% de celulosa y 24 hrs disolución	42
Fig. 4.4	Película de celulosa con 0.7wt% de celulosa y 5 hrs disolución	42
Fig. 4.5	Película de celulosa con 1.4wt% de celulosa y 5 hrs disolución	43
Fig. 4.6	Película con 0.5wt% de celulosa obtenida por disolución acuosa	44
Fig. 4.7	Película con 1wt% de celulosa obtenida por disolución acuosa	44
Fig. 4.8	Nanopartículas de celulosa en solución y en seco	45
Fig. 4.9	Cel/ac/ACIm 0.05wt%	46
Fig. 4.10	Cel/ac/ACIm 0.1wt%	46
Fig. 4.11	Cel/ac/ACIm 0.2wt%	46
Fig. 4.12	Cel/ac/ACIm 0.5wt%	47
Fig. 4.13	Cel/ac/ACIm a diferentes concentraciones	47
Fig. 4.14	Cel/acu/ACIm 0.05wt%	48
Fig. 4.15	Cel/acu/ACIm 0.1wt%	48
Fig. 4.16	Cel/acu/ACIm 0.2wt%	48
Fig. 4.17	Cel/acu/ACIm 0.5wt%	49
Fig. 4.18	Cel/acu/ACIm a las diferentes concentraciones	49
Fig. 4.19	Cel/ac/ACIs 0.05wt%	50
Fig. 4.20	Cel/ac/ACIs 0.1wt%	50
Fig. 4.21	Cel/ac/ACIs 0.2wt%	51
Fig. 4.22	Cel/ac/ACIs 0.5wt%	51
Fig. 4.23	Cel/ac/ACIs a las diferentes concentraciones	51
Fig. 4.24	Cel/acu/ACIs 0.05wt%	52
Fig. 4.25	Cel/acu/ACIs 0.1wt%	52
Fig. 4.26	Cel/acu/ACIs 0.2wt%	52
Fig. 4.27	Cel/acu/ACIs 0.5wt%	53

Fig. 4.28	Cel/acu/ACIs a las diferentes concentraciones	53
Fig. 4.29	Nano/ACIm 0.05wt%	54
Fig. 4.30	Nano/ACIm 0.1wt%	54
Fig. 4.31	Nano/ACIm 0.2wt%	54
Fig. 4.32	Nano/ACIm 0.5wt%	55
Fig. 4.33	Nano/ACIm a 4 diferentes concentraciones de AC	55
Fig. 4.34	Nano/ACIs 0.05wt%	55
Fig. 4.35	Nano/ACIs 0.1wt%	56
Fig. 4.36	Nano/ACIs 0.2wt%	56
Fig. 4.37	Nano/ACIs 0.5wt%	56
Fig. 4.38	Nano/ACIs con 4 diferentes concentraciones de AC	57
Fig. 4.39	AFM de Nanopartículas de celulosa	59
Fig. 4.40	AFM en 3D de nanopartículas de celulosa	59
Fig. 4.41	Histograma del tamaño de nanopartículas de celulosa	60
Fig. 4.42	AFM en tiempo 0	61
Fig. 4.43	AFM en tiempo 1	61
Fig. 4.44	AFM en tiempo 2	61
Fig. 4.45	AFM en tiempo 3	61
Fig. 4.46	AFM 3D en tiempo 0	62
Fig. 4.47	AFM 3D en tiempo 1	62
Fig. 4.48	AFM 3D en tiempo 2	62
Fig. 4.49	AFM 3D en tiempo 3	62
Fig. 4.50	SEM Cel/ac	63
Fig. 4.51	SEM Cel/acu	63
Fig. 4.52	SEM Cel/ac/ACIm 0.05wt%	64
Fig. 4.53	SEM Cel/ac/ACIm 0.5wt%	64
Fig. 4.54	SEM Cel/acu/ACIm 0.05 wt%	65
Fig. 4.55	SEM Cel/acu/ACIm 0.5 wt%	65
Fig. 4.56	SEM Cel/ac/ACIs 0.05wt%	66
Fig. 4.57	SEM Cel/ac/ACIs 0.5wt%	67

Fig. 4.58	SEM Cel/acu/ACIs 0.05wt%	67
Fig. 4.59	SEM Cel/acu/ACIs 0.5wt%	68
Fig. 4.60	SEM Nanopartículas de celulosa	68
Fig. 4.61	SEM Nano/ACIm 0.05 wt%	69
Fig. 4.62	SEM Nano/ACIm 0.1 wt%	69
Fig. 4.63	SEM Nano/ACIm 0.2 wt%	70
Fig. 4.64	SEM Nano/ACIm 0.5 wt%	70
Fig. 4.65	SEM Nano/ACIs 0.05 wt%	71
Fig. 4.66	SEM Nano/ACIs 0.1 wt%	71
Fig. 4.67	SEM Nano/ACIs 0.2 wt%	72
Fig. 4.68	SEM Nano/ACIs 0.5 wt%	72
Fig. 4.69	Espectro FTIR del Ácido Carmínico	74
Fig. 4.70	Espectro FTIR de Cel/ac	77
Fig. 4.71	Espectro FTIR de Cel/acu	77
Fig. 4.72	FTIR de : a) Cel/ac , b)Cel/ac/ACIm 0.05wt%	79
Fig. 4.73	FTIR de : a) Cel/acu, b)Cel/acu/ACIm 0.5wt%	80
Fig. 4.74	FTIR de: a) Cel/ac , b)Cel/ac/ACIs 0.05wt%	82
Fig. 4.75	FTIR de : a) Cel/acu, b)Cel/acu/ACIs 0.5wt%	82
Fig. 4.76	Espectro FTIR para las nanopartículas de celulosa	83
Fig. 4.77	Espectro FTIR para Nano/ACIm con las cuatro concentraciones de AC	85
Fig. 4.78	Acercamiento del espectro FTIR para Nano/AcIm con cuatro diferentes concentraciones de AC	85
Fig. 4.79	Espectro FTIR para las nanopartículas + AC In situ a las diferentes concentraciones	86
Fig. 4.80	Acercamiento del espectro FTIR para las nanopartículas + AC In situ a las diferentes concentraciones	87
Fig. 4.81	Espectro UV-Vis de Nano/ACIs con tratamientos de temperatura y humedad	89
Fig. 4.82	Cadena de celulosa con 10 monómeros, acercamiento al	90

	enlace glicosídico	
Fig. 4.83	Cadena de celulosa con A) 50 y B) 200 monómeros	91
Fig. 4.84	Cinco cadenas de celulosa de 200 unidades	92
Fig. 4.85	Interacción por puentes de hidrógeno que se originan entre cadenas de celulosa	93
Fig. 4.86	Bloque con 10 cadenas de celulosa de 200 monómeros cada una, A) arreglo antiparalelo, B) sección transversal	94
Fig. 4.87	Ácido carmínico	95
Fig. 4.88	Interacción por puentes de hidrógeno que se origina entre moléculas de ácido carmínico.	96
Fig. 4.89	Interacción por puentes de hidrógeno entre moléculas de ácido carmínico (acercamiento de la figura 4.88)	97
Fig. 4.90	Cincuenta moléculas de AC, A) arreglo antiparalelo, B) sección transversal.	98
Fig. 4.91	Interacción por puentes de hidrógeno entre celulosa (2 cadenas de 10 monómeros cada una) y AC (8 moléculas)	99

NOMENCLATURA

AC	Ácido carmínico
AC-Cel	Ácido carmínico - Celulosa
AFM	Microscopía de fuerza atómica (por sus siglas en inglés)
Cel/AC	Celulosa-Ácido carmínico
Cel/ac	Película celulosa disolución ácida
Cel/acu	Película celulosa disolución acuosa
Cel/ACIm	Película celulosa con ácido carmínico por inmersión
Cel/ACIs	Película celulosa con ácido carmínico <i>In situ</i>
Cel/ac/ACIm	Película celulosa disolución ácida con ácido carmínico por inmersión
Cel/ac/ACIs	Película celulosa disolución ácida con ácido carmínico <i>In situ</i>
Cel/acu/ACIm	Película celulosa disolución acuosa con ácido carmínico por inmersión
Cel/acu/ACIs	Película celulosa disolución acuosa con ácido carmínico <i>In situ</i>
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (por sus siglas en inglés)
IR	Infrarrojo
Nano	Nanopartículas
Nano/AC	Nanopartículas con ácido carmínico
Nano/ACIm	Nanopartículas con ácido carmínico por inmersión
Nano/ACIs	Nanopartículas con ácido carmínico <i>In situ</i>
SEM	Microscopía electrónica de barrido (por sus siglas en

	inglés)
UV-Vis	Espectroscopía ultravioleta visible
wt%	Porcentaje en peso

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) a través del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas por el apoyo y la formación educativa que me brindaron durante mi estancia en este programa.

A la Facultad de Químico Farmacobiología e Ingeniería en Tecnología de la Madera, por el apoyo otorgado para el uso de las instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado a través de su programa de becas para posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento económico aportado a través de los proyectos de ciencia básica con números 104257 y 61414.

Al Consejo de la Investigación Científica (CIC) por el financiamiento económico otorgado a través de los proyectos de investigación 2011.

A mi asesor de tesis la Dra. Nelly Flores Ramírez por guiarme y brindarme su apoyo y conocimientos en este trabajo de investigación.

A mis sinodales el Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores, Dr. José Guadalupe Rutiaga Quiñones, Dr. Luis Chacón García y Dr. Salomón Vásquez García, por su atención, tiempo y aportaciones.

Al Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores por sus conocimientos transmitidos, su valiosa ayuda y apoyo brindado durante mi estancia en el programa de maestría.

A mis padres por el apoyo que siempre me han brindado a lo largo de mi formación profesional, por alentarme a salir adelante y por su confianza en la realización de mis sueños.

A mis hermanos y familia, por su compañía y apoyo incondicional.

A mis amigos por su valiosa amistad, sus conocimientos y apoyo que me han brindado y con quienes he compartido muchos momentos que siempre llevaré en mi corazón. Han enriquecido mi vida con su cariño y alegría.

A todas las personas que han dejado huella en mi vida y que de una u otra forma contribuyeron en la culminación de este proyecto.

GLOSARIO

Emulsión inversa	Emulsión en la cual se invierten las fases, es decir, la fase dispersa es una sustancia hidrofílica y la fase continua es lipofílica y se pueden denominar como w/o.
Enlace glicosídico	Enlace que se forma entre los hidroxilos de monosacáridos, liberando una molécula de agua, para formar polisacáridos.
Surfactante	Sustancia cuyas moléculas poseen a la vez un grupo polar y uno apolar. El grupo polar es por lo general un grupo funcional que contiene heteroátomos como O, S, N o P; los grupos polares más comunes son los grupos carboxilato, sulfonato, sulfato, amonio y fosfato.
Temperatura de transición vítrea (T_g)	Temperatura por debajo de la temperatura de fusión, a la cual las porciones amorfas de un polímero se ablandan por un movimiento o vibración molecular y el polímero toma propiedades características a los elásticos.
Yuxtaposición de cadenas	Arreglo de cadenas poliméricas juntas o adyacentes.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Los alimentos han sido envasados o empacados en muy diversas maneras desde hace miles de años. Actualmente todos estos se distribuyen y conservan en algún tipo de envase [Hernández, 2005]. Las funciones básicas del envase consisten en presentar, identificar, conservar, contener, proteger y transportar al producto. Adicionalmente, existen otras funciones como comunicar el estado de los alimentos o actuar como herramienta de mercadotecnia, estas últimas funciones están directamente relacionadas con el envase inteligente [Aguirre y Herranz, 2008].

Las fallas en la detección de patógenos en los alimentos pueden producir avisos que resultan costosos y reducen la confianza de los consumidores. Evidentemente, los dispositivos que pueden detectar las toxinas y agentes patógenos en los productos alimenticios en el campo, almacenamiento o durante el procesamiento, desde el punto de vista científico, es un gran avance en la industria alimentaria [Granda *et al.*, 2009]. Dentro de los materiales más usados en el envasado y como dispositivos de seguridad en los alimentos se encuentran los biopolímeros ya que reúnen propiedades muy atractivas y se emplean como recubrimientos o parte de sistemas activos.

Por otra parte en la seguridad alimentaria la ciencia a escala nanométrica ha tenido un importante avance [Aguirre y Herranz, 2008]; desde envases alimentarios con menor riesgo de migraciones tóxicas al alimento a técnicas de mejora en la detección de patógenos, la nanotecnología ha ofrecido mejoras en la prevención de riesgos alimentarios. Actualmente el desarrollo de dispositivos miniaturizados de detección de microorganismos contaminantes en alimentos genera herramientas de control de seguridad y calidad microbiológica universales [Olivas y Barbosa, 2005]. Los biosensores pueden ofrecer una oportunidad de control de calidad, incrementando la adaptabilidad y alcance de las pruebas de control de calidad, directamente relacionados con el producto. Adicionalmente la inherente especificidad, selectividad y adaptabilidad de los biosensores los hacen

candidatos ideales para su uso en la industria alimentaria [Terry *et al.*, 2008]. Actualmente en la nanotecnología uno de los biopolímeros más utilizados es la celulosa, lo anterior debido a sus características de absorción, ligereza y degradabilidad.

Por la importancia que implica la seguridad alimentaria, ésta investigación contempla el desarrollo de películas y nanopartículas de celulosa, dichas estructuras mantendrán de forma interpenetrada al ácido carmínico que actuará como un indicador de seguridad en alimentos envasados.

1.1 OBJETIVOS

Objetivo General

Conocer la integración y la funcionalidad del ácido carmínico (AC) al incorporarse en nanopartículas y películas de celulosa para su aplicación como un dispositivo de seguridad en los alimentos.

Objetivos Específicos

1. Obtener nanopartículas de celulosa, mediante el proceso de emulsión inversa.
2. Generar películas de celulosa por dos condiciones controladas variando sus concentraciones.
3. Determinar la morfología y la estructura química de las nanopartículas y películas de celulosa que soportarán el ácido carmínico.
4. Conocer el grado de integración del ácido carmínico en su matriz primaria de celulosa, por medio de las asociaciones de grupos funcionales AC – celulosa, empleando FTIR.
5. Valorar las modificaciones morfológicas de las nanopartículas y películas de celulosa con ácido carmínico (AC) a través de SEM.
6. Evaluar la actividad del AC ante condiciones variables de humedad y temperatura.
7. Determinar a través de simulación molecular las conformaciones e interacciones moleculares que se generan en el sistema AC-celulosa

1.2 HIPÓTESIS

A mayor superficie existe mayor área de alojamiento para sustancias activas (colorante) que puede encontrar sitios de fijación para actuar con una menor interacción intramolecular y manifestar mayor respuesta a agentes externos a su sistema (colorante-celulosa), promoviendo una acción “activa” de detección en función de factores externos.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Polímeros naturales

Un polímero (del griego poly, muchos; meros, parte, segmento) es una estructura cuyas moléculas son múltiplos de unidades de peso molecular bajo. La unidad de bajo peso molecular es el monómero. El término polímero designa una combinación de un número no especificado de unidades [Nicholson, 2006].

Los polímeros, son moléculas orgánicas, con pesos moleculares desde 10, 000 hasta más de 1, 000, 000 g/mol [Askeland, 1998]. También son conocidos como macromoléculas y su estructura se deriva de la repetición de unidades estructurales más pequeñas [Keyser, 1985].

Los polímeros naturales o biopolímeros son términos comúnmente usados para referirse a polímeros sintetizados biológicamente por la naturaleza. Se pueden obtener directamente del reino animal o vegetal. Los polisacáridos son una clase de polímeros naturales que parten de moléculas de monosacáridos unidas por enlaces glicosídicos para producir polímeros de alto peso molecular, los cuales pueden romperse por hidrólisis. [Khor, 2001; Morrison-Boyd, 1998].

Los polímeros naturales tales como la seda, lana, celulosa, etc., se han empleado abundantemente y han tenido mucha importancia a lo largo de la historia [Askeland, 1998].

Una línea prioritaria de investigación con gran potencial son precisamente los biopolímeros; pueden ser obtenidos por extracción a partir de biomasa (celulosa, almidón, quitosano, gelatina, colágeno, gluten, zeína, sueros, ceras, etc.), por síntesis química a partir de monómeros obtenidos de biomasa (poliácido láctico) y otros poliésteres), o bien producido por microorganismos (celulosa bacteriana, polihidroxialcanoatos, etc.). Actualmente los biopolímeros basados en polisacáridos, proteínas o lípidos, son los que

están siendo objeto de un mayor estudio como material de envase o recubrimientos de alimentos. La gran ventaja de la utilización de estos materiales es que son naturales, biodegradables y en muchas ocasiones pueden ser extraídos de residuos o como subproductos de la industria agrícola o alimentaria. Es por ello que la ventaja es doble, ya que el coste de la materia prima se abarata y porque además, se le da un valor añadido a un residuo o subproducto industrial. [Weber, 2000].

Los biopolímeros presentan diversas características que les hacen materiales potenciales para su aplicación en envases alimentarios. Estos materiales provienen de una fuente renovable, pueden ser biodegradables, no tóxicos y muchos de ellos comestibles por lo que se podrían consumir junto con el alimento (envase ideal, residuo cero). Tienen propiedades formadoras de películas por lo que pueden formar recubrimientos o películas homogéneas a las que se puede incorporar aditivos (aromas, colorantes, edulcorantes, etc.) que pueden mejorar las propiedades organolépticas del alimento y en muchas ocasiones (especialmente en el caso de proteínas) pueden tener de por sí el componente nutricional adicional. Estos biopolímeros pueden tener por sí mismos actividad antimicrobiana/antioxidante o llevar dichos agentes activos incorporados y realizar una liberación controlada. Debido a la estructura molecular compleja de los biopolímeros, estos pueden realizar un control más adecuado de las propiedades físico químicas (transferencia de gas, lípidos u aromas) y permiten un control físico-químicos y microbiológico de los alimentos igual o superior a los plásticos convencionales [Olivas y Barbosa, 2005].

2.2 Celulosa

La celulosa es el polímero natural, renovable y biodegradable más abundante de la tierra [Granja y Barbosa, 2001; Siqueira *et al.*, 2010]. Es un componente estructural biosintetizado como microfibrillas dándole rigidez a las plantas [Siqueira *et al.*, 2010; Ahrenstedt, 2007]. Se encuentra formando parte de la madera, la cual constituye el tronco de los árboles y plantas, siendo el sostén principal, aunque también se encuentra en el bagazo de caña de azúcar y en las hojas de maíz [Odián, 2004]. La celulosa es el principal constituyente de la pared celular en todas las plantas, además tiene un alto grado de

cristalinidad, siendo ésta la responsable de las propiedades físicas y mecánicas de la madera [Zuluaga *et al.*, 2007; Odian, 2004].

La celulosa comercial se deriva principalmente del algodón y de la madera. La madera contiene cerca del 40-50% de celulosa, junto con la cual se encuentra la lignina y otros polisacáridos de bajo peso molecular. El ejemplo más puro de celulosa es el algodón con un porcentaje mayor al 90% [O'dian, 2004].

2.2.1 Estructura molecular

La celulosa es un homopolisacárido lineal no ramificado, conformado por unidades de β -D-glucopiranososa o glucosa, con una conformación sindiotáctica, unidas por enlaces β (1-4) glicosídicos, y estabilizado por los numerosos puentes de hidrógeno [O'Sullivan, 1997; Zuluaga *et al.*, 2007]. Se ha encontrado que los anillos de piranososa presentan una conformación de silla con los grupos hidroxilos en posición ecuatorial [O'Sullivan, 1997].

La conformación más estable de uniones β (1-4) involucra giros alternos de 180° cada 2 unidades de glucosa, por lo cual la unidad de repetición de la celulosa mejor dicho es la celobiosa (Fig. 2.1) en lugar de la glucosa [Ahrenstedt, 2007].

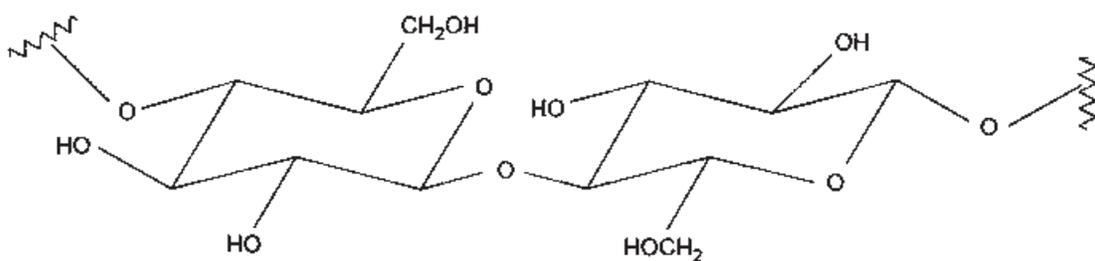


Fig. 2.1 Unidad de repetición de la celulosa (celobiosa) [O'Sullivan, 1997].

Las cadenas lineales de celulosa (Fig. 2.2) interaccionan por medio de múltiples puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, dando lugar a la formación de microfibrillas con regiones altamente ordenadas que le dan características de insolubilidad, rigidez y resistencia al

ataque enzimático y que se conocen como regiones cristalinas [Mejía *et al.*, 2002; Sjöström, 1993]. Estas características hacen que sea insoluble en agua, y originan fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales [Sjöntiom, 1993].

Cuando a lo largo del haz de cadenas se rompen los puentes de hidrógeno se forman regiones denominadas amorfas, que permiten su hidratación y mejor accesibilidad al ataque enzimático [Mejía *et al.*, 2002]. Las cadenas de celulosa tienen un grado de polimerización de aproximadamente 10 000 unidades de glucopiranosas en celulosa de madera y 15 000 en celulosa de algodón [O'Sullivan, 1997].

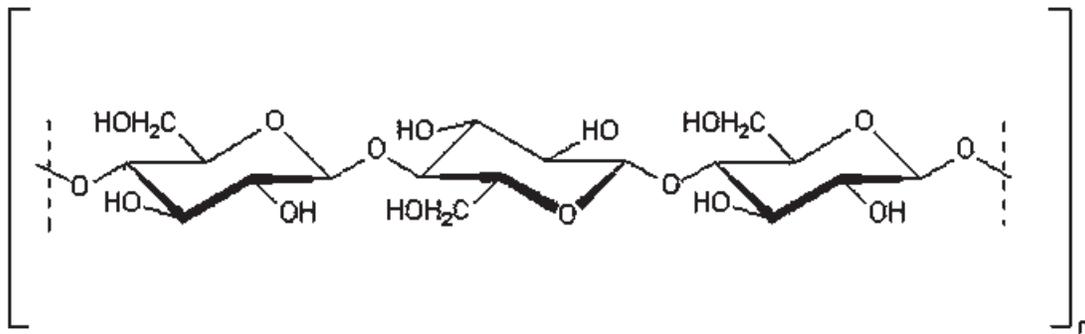


Fig. 2.2 Celulosa

2.2.2 Arreglo microscópico

Las moléculas individuales de la celulosa se encuentran formando haces microfibrilares y que medidas y observadas por DRX y SEM, éstas áreas parecen estar nítidamente ordenadas, paralelas unas con otras y estrechamente empaçadas, mostrando un arreglo similar a un cristal. Sin embargo en otras zonas, las moléculas dentro de las fibrillas están desordenadas y su arreglo es completamente al azar. Lo anterior es conocido como la zona cristalina y amorfa de la estructura de la celulosa, dependiendo del origen de la celulosa y de su tratamiento, las áreas de cristalinidad y amorfismo variarán considerablemente. Estas áreas llegan a manifestarse por diferencias en los difractogramas, en donde, la zona cristalina u ordenada muestran arcos discontinuos, relativamente agudos. Mientras que en la zona amorfa o desordenada, se presentan círculos concéntricos [Libby, 1981].

En las zonas cristalinas, los grupos hidroxilo de una molécula de celulosa se aproximan muy íntimamente a los de una molécula vecina. Estas cadenas de celulosa se sostienen entre sí por fuerzas de valencia secundaria, algunas de las cuales se atribuyen a fuerzas de van der Waals y otras a los más resistentes puentes de hidrógeno. En la zona amorfa o llamada también zona accesible, se atribuye las propiedades de elasticidad y capacidad de hinchamiento, dado que es donde primero se hace evidente la actividad química de la celulosa, puesto que la entrada a la zona cristalina o inaccesible es lenta y más difícil de penetrar dado que es mucho más resistente al ataque, lo cual explica el comportamiento ordenado de la zona [Libby, 1981].

2.2.3 Solubilidad

La celulosa es insoluble en agua fría y caliente, es insoluble en solventes orgánicos neutros tal como el benceno, éter, cloroformo y tetracloruro de carbono. Es casi insoluble en disoluciones acuosas diluidas de ácidos y álcalis. Sin embargo, se disuelve fácilmente en ácido sulfúrico del 70-75% y en ácido clorhídrico al 44%, es también soluble en ácido fosfórico al 85%. Muchos procesos son usados para extraer las microfibrillas de la pared celular; estos están generalmente basados en tratamientos mecánicos o químicos [Zuluaga, 2007].

2.2.4 Usos y aplicaciones

La celulosa es uno de los materiales más utilizados por el hombre desde tiempos remotos y en la actualidad se encuentra comercialmente disponible en una gran variedad de presentaciones, siendo el papel una de las más conocidas. Se estima que al año se sintetizan 180 billones de toneladas de celulosa principalmente por las plantas, por lo que constituye una de las reservas de energía renovable más abundante en la naturaleza. Por varias décadas los esfuerzos de muchos investigadores se han concentrado en buscar alternativas para el uso de este polisacárido como materia prima para obtener glucosa, mediante su hidrólisis, que al utilizarla como sustrato en la industria de fermentaciones permitiría obtener una

gama amplia de productos; entre ellos etanol para su uso como combustible [Mejía *et al.*, 2002].

En la industria de alimentos los biopolímeros son ampliamente utilizados o estudiados, principalmente la celulosa y sus derivados como la metil celulosa (MC), hidroxipropilcelulosa (HPMC) y carboximetilcelulosa (CM), almidones modificados, dextranos, alginatos y carragenatos, pectinas, quitosano, pululano. Entre las proteínas mas estudiadas están la gelatina, colágeno, zeína, gluten, caseína, suero de leche, proteína de soja, etc. [Gennadios, 2002].

Actualmente las formas de aplicación en las que se pueden encontrar estos biopolímeros comprenden las siguientes formas:

- Como material de envase con el fin de sustituir parcialmente el material sintético, mejorar la permeabilidad a los gases en las películas, etc. Debido a su sensibilidad al agua la investigación actual se centra en este campo en la mejora de la resistencia mecánica y mejora de la resistencia al agua de estos materiales biopoliméricos. Actualmente se estudian diferentes tipos de películas compuestas, nanocompuestos etc., que debido a la mezcla con materiales más hidrofóbicos (lípidos, arcillas, polímeros, lípidos...) aumente la tortuosidad de la difusión y reduzca la permeabilidad [Olabarrieta, 2005].
- Formando una delgada película sobre la superficie del alimento: para control de permeabilidad de gases, oxidaciones pérdidas de aroma y humedad. Como soporte mecánico y para la incorporación de antioxidantes o antimicrobianos.
- Como recubrimiento o capa entre diferentes componentes de un alimento (pizzas, bombones, etc.) para restringir migraciones de sustancias, humedades, etc. y preservar texturas [Ghosh *et al.*, 2002].
- Como filmes comestibles (refrescante e higiene bucal).

- Como parte de envases activos (antimicrobianos, antioxidantes). Bien como recubrimientos activos o como portadores de sustancias activas que permitan una liberación controlada de ellas (bacteriocinas, péptidos, aceites esenciales, etc.) y mejore la conservación del alimento [Han, 2000; Appendini y Hotchkiss, 2002].

Además de la industria de alimentos la celulosa y sus derivados también se utilizan en la fabricación de explosivos, celuloide, seda artificial, barnices, en la medicina, cosmetología, industria farmacéutica, adhesivos, cerámica, etc. [Hon y Shiraishi, 2001].

Debido a las características de absorción, ligereza y degradabilidad de la celulosa, se le está dando una importante aplicación en el área de la nanotecnología, ya que el interés de los materiales nanoestructurados es muy elevado, pues la reducción de tamaño hasta niveles de sólo uno o dos órdenes de magnitud superiores al tamaño atómico implica la aparición de nuevas propiedades, abriéndose por completo un abanico de posibilidades a la obtención de nanopartículas con un gran número de usos y aplicaciones [Weiss *et al.*, 2006].

2.3 Ácido Carmínico (AC)

El color es conocido como un fenómeno físico asociado a las múltiples combinaciones de la luz. Al respecto, el color se asocia con los colorantes y pigmentos, por lo cual es importante advertir que un colorante presenta un tamaño de partícula pequeño, buena solubilidad en diferentes solventes y, posee una estructura amorfa, y tiene la capacidad de absorber luz; por el contrario, los pigmentos presentan un tamaño de partícula más grande, son insolubles en solventes polares, y dispersan la luz. El uso de pigmentos está siendo cada vez más restringido por el incremento en los controles ambientales, esto debido a que algunos de ellos presentan cierto grado de toxicidad, y pueden implicar riesgos cancerígenos. Sin embargo, es difícil suplantarlos ya que su utilización es muy variada e importante a nivel mundial. Uno de los pigmentos que presenta mejores características tecnológicas y de mayor aplicación, es *el ácido carmínico (AC)*, extraído de la grana cochinilla o *Dactylopius coccus* del nopal [Fernández *et al.*, 2009].

Nocheztli es un vocablo náhatl que significa “sangre de nopal” y que los aztecas utilizaban para referirse al colorante extraído de la grana cochinilla. El cromóforo que otorga el color al extracto de la grana cochinilla (insecto parásito del nopal), es el ácido carmínico, que químicamente es una hidroxiantraquinona, la cual presenta una coloración rojo brillante, y a través de la historia ha tenido gran importancia en distintos contextos [Ibarra *et al.*, 2005]. El ácido carmínico es uno de los colorantes más antiguos conocidos en la historia de la humanidad, es un producto natural, pero también puede ser obtenido sintéticamente [Díaz y Luna, 2005].

A mediados del siglo XX se detectaron casos de alergias provocadas por el uso de colorantes sintéticos en alimentos industrializados e incluso algunos de estos son cancerígenos. Por tal razón, se ha intensificado la búsqueda de colorantes inocuos para la salud humana. Es así como en nuestros días, se retoma el uso de la grana de cochinilla como colorante en diversas industrias [Ibarra *et al.*, 2005].

2.3.1 Estructura molecular

El ácido carmínico (AC; ácido 7- α -D-glucopyranosil-9,10-dihidro-3,5,6,8 tetrahidroxi-1-methyl 9,10-dioxo-2-antraceno-carboxílico; 7- β -D-glucopyranosil-9,10-dihidro-3,5,6,8 tetrahidroxi-1-methyl 9,10-dioxo-2-antraceno-carboxílico), cuya estructura se muestra en la Fig. 2.3 es una antraquinona, de fórmula $C_{22}H_{20}O_{13}$, cristaliza en prismas rojos, no tiene punto de fusión y se descompone a 120°C [Carvalho y Collins, 1997; Cañamares *et al.*, 2006; Gibaja y Salaverri, 1998].

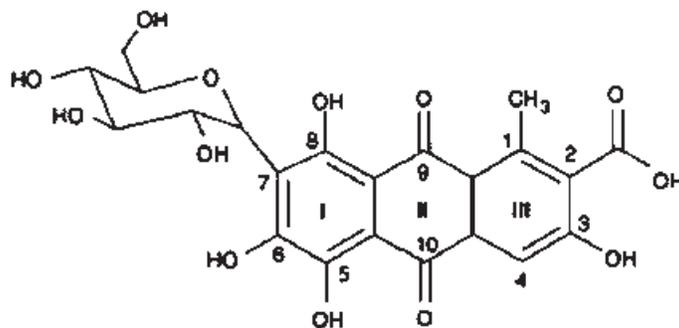


Fig. 2.3 Estructura del ácido carmínico

El ácido carmínico es un pigmento natural orgánico extraído a partir del cuerpo seco del insecto *Dactylopius coccus L. costa* denominado grana o cochinilla, cuyo hospedero natural es el nopal *Opuntia ficus indica* [Gibaja y Salaverry, 1998]. Estos insectos de 3 – 5 mm de largo, se identifican por la presencia de una secreción blanca parecida a un algodón. Entre 80 000 – 100 000 insectos son requeridos para producir un kilogramo de cochinilla seca para exportación. La cochinilla (Fig. 2.4) es producida en algunas ciudades del mundo, siendo Perú el primer productor mundial (78%). México es uno de los principales productores, que cuenta como importadores principales a Europa, EUA y Japón [Ibarra *et al.*, 2005; Méndez *et al.*, 2004; Cabrera, 2005; Sáenz *et al.*, 2004; Flores, 1996].



Fig. 2.4 Insectos de cochinilla hembra: a) Vista superficial sobre planta de nopal, b) Cuerpo de la hembra goteando ácido carmínico.

2.3.2 Color y pH

El grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) y los cuatro grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) fenólicos de las posiciones C-3, C-5, C-6 y C-8 desprotonables, contribuyen a los cambios de color y de pH del ácido carmínico; siendo anaranjado a $\text{pH} = 3.0$, rojo a $\text{pH} = 5.5$ y púrpura a $\text{pH} = 7.0$ [Gibaja y Salaverry, 1998].

2.3.3. Estabilidad

El AC es el colorante con mejores características tecnológicas entre los naturales, pero se utiliza cada vez menos debido a su alto precio. Es estable a la luz, tratamientos térmicos y a

la oxidación. El color de la solución del ácido carmínico, no es estable a los cambios de pH [Gibaja y Salaverry, 1998].

2.3.4 Solubilidad

El AC es soluble en agua, alcoholes y ácido sulfúrico diluido. Insoluble en los hidrocarburos y los aceites comestibles [Gibaja y Salaverry, 1998].

2.3.5 Usos y aplicaciones

El AC puro es comercializado como polvo o como soluciones con concentraciones en el intervalo de 1 – 10 wt%, su nivel de pureza está entre el 50 – 60%. Este pigmento compete con el rojo betanin y con los antocianinos como colorante de alimentos. Es utilizado como pigmento o colorante, cuando se emplea como pigmento (líquido), el método de coloración es por disolución en ella la intensidad es directamente proporcional a su pureza. En cambio cuando se usa como colorante (sólido), el método de coloración es por dispersión (distribución del color a lo largo de todo el material), de tal manera que la coloración no es proporcional a su pureza [Pérez, 1992; Rasmus *et al.*, 1996; Sugimoto, 2002].

Entre las principales aplicaciones del AC está su utilización como agente colorante de: alimentos cárnicos, embutidos, salsas, bebidas alcohólicas, lácteos, postres de gelatina, yogures, caramelos, cerezas, cosméticos, dentífricos, fármacos, etc. [Gibaja y Salaverry, 1998]. Además el AC ha sido usado como reactivo para la determinación fluorimétrica de diversas especies inorgánicas tales como Boro, Tungsteno, Molibdeno y Paladio [Panadero *et al.*, 1997]. En años recientes el AC ha sido probado para exhibir una importante actividad biológica como agente antitumoral. Además este pigmento es muy importante para análisis químico como reactivo para la determinación de metales y otras especies químicas [Cañamares *et al.*, 2006; Fain *et al.*, 2007].

El AC ha llamado la atención de investigadores, para estudiar su fotodegradación, propiedades de fluorescencia, comportamiento ácido base y procesos de fotoenvejecimiento [Cañamares *et al.*, 2006].

2.4 Envases inteligentes

En los últimos años se han producido una serie de cambios en las preferencias de los consumidores y en la manera en que los alimentos son producidos, transformados y comercializados. Por otro lado los consumidores exigen mayor calidad, seguridad e información de los productos que consumen.

En cuanto a la industria, se han producido una serie de cambios, tendientes a satisfacer las demandas de los consumidores, y a adaptarse a la globalización de los mercados, lo que implica mayores distancias y tiempos en la distribución de los productos alimenticios, y a reducir costos mediante la centralización de las actividades de producción e investigación y el incremento de los tiempos de rotación de la producción, distribución y venta de los productos alimenticios [AESAN, 2010].

Todos estos cambios se reflejan en un incremento continuo en la demanda de la industria para aumentar la vida comercial (vida útil) de los productos alimenticios envasados y en la demanda de los consumidores para mejorar la información sobre la seguridad y la calidad de los productos que consume. Cada vez se demandan más y mejores prestaciones a los envases y para responder a estos cambios, nuevas necesidades y desafíos, se desarrollan los sistemas de envasado o envases activos e inteligentes [Dainelli *et al.*, 2008].

- Envases activos. A diferencia de los envases tradicionales, a los que se exige que sean totalmente inertes, los activos están diseñados para interactuar de forma activa y continua con su contenido. Esta interacción implica siempre una transferencia de masa, ya sea para incorporar sustancias al contenido del envase (el alimento y su entorno) o absorber componentes del mismo. La finalidad de esta interacción es ampliar el tiempo de conservación o mantener o mejorar el estado de los alimentos [Dainelli *et al.*, 2008].

Los envases activos incluyen sistemas que absorben/eliminan o regulan compuestos como el oxígeno, radicales, etileno, humedad o aquellos que pueden ocasionar olores o sabores desagradables en los alimentos. Otros sistemas liberan sustancias químicas como conservantes, antioxidantes, colorantes, aromas, etc. [AESAN, 2010].

- Envases inteligentes. Controlan el estado de los alimentos envasados o de su entorno. Son sistemas que monitorizan las condiciones del alimento envasado, para dar información acerca de la calidad del mismo durante el transporte y el almacenamiento [Dainelli *et al.*, 2008].

El envase inteligente es capaz de suministrar información acerca de alguna condición del alimento envasado; por ejemplo, indica si hay entrada de aire en un producto envasado al vacío, fugas de gases en envases con atmósfera protectora, manifiesta la presencia de alteraciones en la calidad del alimento (aminas volátiles, microorganismos, etc.) o rotura de la cadena de frío, proporcionando alerta sobre la historia de la temperatura a la que estuvo expuesto el producto y del tiempo de exposición [AESAN, 2010]. Legalmente se denominan “materiales y objetos inteligentes en contacto con alimentos” y se definen como los materiales y objetos que controlan el estado de los alimentos envasados o el entorno de éstos [UE, 2004].

En la actualidad los materiales y objetos activos e inteligentes se encuentran autorizados de manera general en el marco del Reglamento (CE) N° 1935/2004 sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos [UE, 2004], en donde se definen y se establecen los requisitos especiales que deben cumplir; y de una manera específica en el Reglamento (CE) N° 450/2009 [UE, 2009].

Existen dos tipos básicos de sensores comunicativos utilizados en los envases inteligentes: los que acumulan y transmiten datos (como actualmente lo harían los códigos de barras y etiquetas (tags) de identificación por radiofrecuencia); y los que se emplean para monitorizar las condiciones ambientales externas y advertir mediante un cambio físico

observable en caso de que sea necesario, como los sensores visuales por cambios de color [Aguirre y Herranz, 2008].

2.4.1 Sensores indicadores mediante cambios visuales observables

Como se ha comentado anteriormente, los dispositivos indicadores son aquellos capaces de transmitir información sobre el estado del producto al consumidor mediante un cambio de color visible a simple vista. En función del parámetro de control del dispositivo, podemos encontrar en el mercado gran variedad de éstos, tales como:

Indicadores compuestos por tintas termocrómicas

También llamadas tintas termosensibles, cambian a su color original cuando alcanzan la temperatura de activación. Las aplicaciones de estas tintas son variadas. Algunas son sensibles a la temperatura del cuerpo y están diseñadas para mostrar el color a la temperatura normal ambiente cambiando o desapareciendo. Otras son aquellas que responden a las altas temperaturas [AESAN, 2010].

Indicadores de tiempo-temperatura

Son pequeños dispositivos que muestran fácilmente cambios medibles, irreversibles y reproducibles dependientes del tiempo y/o de la temperatura.

La idea básica que subyace detrás de estos indicadores es que la calidad del alimento se deteriora tanto más rápidamente cuanto más alta es la temperatura de exposición, debido a que se aceleran las reacciones químicas, bioquímicas o el crecimiento microbiano [Aguirre y Herranz, 2008].

Indicadores de humedad

Son etiquetas que indican variaciones en la humedad mediante un cambio de color. Estos indicadores pueden contener cloruro de cobalto, que reacciona con la humedad virando de azul a rosa cuando ésta aumenta, o pueden estar compuestos por cloruro de cobre, que vira de amarillo a verde [Aguirre y Herranz, 2008].

Indicadores de frescura/vida útil

Dan una indicación acerca de algún parámetro de calidad del producto envasado, de la pérdida de frescura o del deterioro del producto alimenticio, tanto químico como bacteriológico. Su indicación de frescura se basa en la detección de metabolitos volátiles producidos por el deterioro de los alimentos tales como dióxido de carbono, diacetatos, aminas (del pescado), amoníaco o sulfuro de hidrógeno [Dainelli *et al.*, 2008].

2.4.2 Aplicaciones

Algunos de los sensores ya comercializados son los siguientes:

Sensor para pescado *freshtag*: son unas pequeñas etiquetas. Esta etiqueta posee un angosto agujero en el reverso, por el cual pasan los vapores desprendidos durante el almacenamiento del pescado y se difunden por la matriz de la etiqueta, donde está el detector. Este detector reacciona con la trimetilamina desprendida durante la descomposición del óxido de trimetilamina del pescado, que es el causante del mal olor, produciendo un cambio de color en la etiqueta que vira de amarillo a azul oscuro conforme se va produciendo la degradación [Aguirre y Herranz, 2008].

Sensor para frutas *Ripeseense*: este indicador está diseñado para fruta climatérica, la cual sigue madurando una vez recolectada. El sensor cambia de color en respuesta a los compuestos aromáticos volátiles emitidos por la fruta en su proceso de maduración. La etiqueta vira de rojo a amarillo pasando por el naranja, indicando el estado de madurez de la fruta [Aguirre y Herranz, 2008].

Película plástica con tecnología *Toxin Guard*: la película detecta el crecimiento bacteriano de *Pseudomonas sp.*, que es un microorganismo no patógeno pero alterante, lo que provoca en la película la aparición de unas X en el centro de cada círculo, mostrando de esta manera que el alimento ha perdido frescura y no debe ser consumido [Aguirre y Herranz, 2008].

Etiquetas I Point (I Point A/B): son indicadores de historia completa que muestran respuesta independientemente de la temperatura umbral. El dispositivo consiste en dos

partes, una contiene una solución enzimática, la otra una sustancia lipídica y un indicador de pH. Para activarlo, se rompe la separación entre las partes y ambos compuestos se mezclan. Mientras la reacción tiene lugar, la sustancia lipídica se hidroliza y el cambio de pH se observa con una variación de color [Bataller *et al.*, 2005].

Etiquetas Lifelines Fresh.Scan (Lifelines Technology Inc): son etiquetas con un anillo central polimérico que, por acción de la temperatura, se oscurece, informando al consumidor del estado del producto [Bataller *et al.*, 2005].

2.4.3 Biosensores

En la actualidad, el análisis de alimentos representa un porcentaje muy pequeño en el mercado total, pero con los avances tecnológicos, los biosensores en el diagnóstico en la industria alimentaria están en expansión. El desarrollo de los biosensores, benefician el control de calidad, y de seguridad, ofreciendo mejoras en la prevención de riesgos alimentarios [Terry, 2005].

El desarrollo y la producción de herramientas de detección de microorganismos contaminantes enfocados a alimentos específicos generan la posibilidad de desarrollar herramientas de control de seguridad y calidad microbiológica universales [Granda *et al.*, 2009].

Las fallas en la detección de patógenos en los alimentos pueden producir avisos que resultan costosos y reducen la confianza de los consumidores. Evidentemente, los dispositivos de nano escala que pueden detectar las toxinas y agentes patógenos en los productos alimenticios en el laboratorio o, mejor aún, en el campo, almacenamiento o durante el procesamiento, desde el punto de vista científico, es un gran paso en la detección y en la industria alimentaria [Granda *et al.*, 2009]. La inherente especificidad, selectividad y adaptabilidad de los biosensores los hacen candidatos ideales para su uso en la industria alimentaria. La calidad es la cuestión clave común a todos los productos alimenticios. Los biosensores ofrecen una oportunidad de Control de Calidad (CC), incrementando la

adaptabilidad y alcance de las pruebas de control de calidad, directamente relacionados con la calidad del producto [Weiss *et al.*, 2006].

2.5 Nanotecnología

Richard Feynman, premio Nobel de Física, es considerado el padre de la nanotecnología, quien en 1959 propuso fabricar productos en base a un reordenamiento de átomos y moléculas [Edelstein y Cammarata, 1998]. La nanotecnología es la ciencia que se encarga del estudio y desarrollo de materiales en dimensiones a nanoescala (≤ 100 nm). Las estructuras a esta escala han mostrado tener propiedades únicas y novedosas [Granda *et al.*, 2009]. El uso de las nanopartículas actualmente tiene un auge muy importante en el desarrollo de la ciencia y tecnología, por lo que se han empleado en diversidad de áreas, dentro de las cuales destacan la medicina, industria farmacéutica, electrónica e industria de alimentos [Weiss *et al.*, 2006]. La investigación y el desarrollo de la ciencia a escala nano, ha tenido gran avance en el ámbito de la seguridad alimentaria, desde envases con menor riesgo de migraciones tóxicas al alimento a técnicas de mejora en la detección de patógenos [Almengor, 2009].

2.5.1 Polímeros en la nanotecnología

Las áreas principales de desarrollo de la nanotecnología se basan en la disciplina de coloides y la ciencia de los polímeros, en donde éstos son la materia principal de síntesis. Dentro de los más versátiles se encuentran los polímeros tanto de origen natural como sintético. Uno de los polímeros naturales de origen vegetal que más importancia y desarrollo ha tenido a lo largo de la historia, es la celulosa, dadas sus características notables de absorción, ligereza y degradabilidad. El interés que despiertan los materiales nanoestructurados es muy elevado, ya que la reducción del tamaño hasta niveles de sólo uno o dos órdenes de magnitud superiores al tamaño atómico implica la aparición de nuevas propiedades, abriéndose por completo un abanico de posibilidades a la obtención de nanopartículas con un gran número de usos y aplicaciones [Weiss *et al.*, 2006].

2.5.2 Aplicaciones

La nanotecnología tiene el potencial para mejorar la calidad y la seguridad de los alimentos. Existen muchas nuevas aplicaciones para una mejor seguridad alimentaria, entre ellas, el empaque, factor clave para garantizar la inocuidad de productos alimenticios. Los empaques que incluyen nanomateriales pueden ser “inteligentes”, lo que significaría que podrían responder a condiciones ambientales o incluso alertar al consumidor sobre una probable contaminación del producto y/o la presencia de agentes patógenos [Almengor, 2009].

Una de las aplicaciones más impactantes de la nanotecnología es el desarrollo de nanosensores que pueden ser colocados en las instalaciones de fabricación y de distribución de alimentos y en el propio empaque de los productos para detectar la presencia de microorganismos, químicos y otros contaminantes [Almengor, 2009].

Las aplicaciones de los materiales nanoestructurados se están desarrollando muy rápidamente, algunas de ellas, ya presentes en los mercados o cerca de su comercialización, son las siguientes:

- Sensores de gases destinados a detectar la presencia de gases nocivos en ambientes cerrados o abiertos, o aromas que caracterizan la calidad de bebidas y productos alimenticios ("nariz electrónica").
- Sistemas fotovoltaicos de alta eficiencia para la conversión de la energía solar.
- Nuevos materiales con una elevada relación resistencia/masa para aplicaciones aeroespaciales, biomédicas y en medios de transporte.
- Embalajes de productos alimenticios con mejores características de barrera a la penetración de gases y capacidad para indicar el estado de conservación.
- Técnicas diagnósticas basadas en el sistema denominado "lab-on-a-chip", para la realización de análisis clínicos y genéticos con mínimas cantidades de muestra y en tiempo real.
- Cosméticos, en especial para la protección contra la radiación solar.
- Revestimientos superficiales con resistencia a la corrosión, al rayado y al desgaste notablemente mejorado.

- Nanosensores en el campo de la seguridad alimentaria, los cuales realizan análisis de la composición, estimación de vida útil y la frescura. Así también para la detección y neutralización de microorganismos alterantes.
- Aqua nova (empresa alemana) desarrolló Novasol, sistema para la aplicación de antioxidantes. Consiste en una solución que está lista para usarse y la cual es soluble tanto en agua como en aceite. Está dirigido a fabricantes de alimentos y bebidas que desean introducir vitamina C y E en sus productos.
- La empresa Oilfresh utilizó nanopartículas para aumentar la vida de freído de los aceites comestibles. Es una placa metálica, plana y vertical, elaborada con nanocerámica, que se inserta en la freidora para inhibir el proceso de polimerización del aceite de freído, reduciendo su deterioro [Almengor, 2009; Moncada, 2006].

2.6 Métodos de caracterización

El estudio de los polímeros ha sido de gran importancia para la ingeniería y manufactura que hasta hace poco tiempo, se mantuvo por estudios empíricos. Hoy en día, con el desarrollo de nuevos instrumentos y teorías, este campo en la ciencia de los polímeros ha crecido rápidamente para comprender el fenómeno superficial a nivel molecular [Sperling, 2006].

Enseguida se describen las técnicas empleadas para caracterizar los materiales obtenidos, permitiendo conocerlos morfológicamente, por medio de Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Microscopía de fuerza atómica (AFM); así como estructuralmente utilizando Espectroscopía de Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y Espectroscopía UV-Vis.

2.6.1 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La Microscopía de Fuerza Atómica, es una técnica que produce imágenes topográficas de una superficie con resolución atómica en tres dimensiones. Casi cualquier sólido puede ser estudiado, sea aislante, conductor, semiconductor, transparente u opaco. Las muestras pueden ser analizadas bajo cualquier sistema, aire, líquido o vacío; por lo que es un sistema de imagen muy poderoso. El análisis consta de una punta o extremidad burda montada en un cantiléver. Cuando la punta se encuentra a unos pocos Angstroms de la superficie de la muestra, se generan fuerzas repulsivas de Van der Waals entre los átomos de la punta y la muestra, provocando la deflexión del cantiléver. La magnitud de esta deflexión depende de la distancia comprendida entre la punta y la muestra [Brundle *et al.*, 1992].

2.6.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Esta técnica constituye una de las más empleadas para el análisis de superficies, gracias a que proporciona una imagen visual tridimensional, el análisis cualitativo es relativamente directo [Sperling, 2006].

Para obtener la imagen por microscopia electrónica, la superficie de una muestra sólida es barrida según un modelo raster con un haz de electrones muy fino. Un raster es un modelo de barrido similar al utilizado en un tubo de rayos catódicos en el que un haz de electrones barre la superficie en línea recta, vuelve a la posición inicial y después es desplazado hacia abajo a una distancia establecida. Este proceso se repite hasta que el área deseada de la superficie ha sido barrida. Al barrer la superficie con una pistola de electrones de energía elevada se producen diversos tipos de señales. Estas señales incluyen electrones retrodispersados y secundarios, además fluorescencia de rayos X y otros fotones de diversas energías. El microscopio electrónico de barrido forma la imagen con los electrones secundarios que se generan en la interacción de la radiación electrónica con una capa superficial y fina de la muestra mediante un proceso de rastreo y los electrones reflejados

son atraídos por un detector que proporciona las imágenes topográficas [Skoog y Leary, 1995].

Proporciona información morfológica y topográfica sobre la superficie de los sólidos que son normalmente necesarias para entender el comportamiento de éstas, donde las áreas oscuras indican las zonas de baja reactividad y las áreas blancas a las zonas rugosas y relieves superficiales. Por lo que la microscopía electrónica es a menudo la primera etapa en el estudio de las propiedades de las superficies de un sólido [Skoog y Leary, 1995].

2.6.3 Espectroscopía infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Espectroscopía (IR) es la rama de la espectroscopía que trata con la parte infrarroja del espectro electromagnético. Esta cubre un conjunto de técnicas, siendo la más común una forma de espectroscopía de absorción. Así como otras técnicas espectroscópicas, puede usarse para identificar un compuesto e investigar la composición de una muestra. La región infrarroja del espectro incluye la radiación con números de onda comprendidos entre los 12 800 y los 10 cm^{-1} . Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los instrumentos, es conveniente subdividir el espectro infrarrojo en tres regiones:

- El infrarrojo cercano. Va de la región de los 14000-4000 cm^{-1} , puede excitar sobretonos o vibraciones armónicas.
- El infrarrojo medio. Cubre la región 4000-400 cm^{-1} , puede ser usado para estudiar las vibraciones fundamentales y la estructura rotacional vibracional.
- El infrarrojo lejano. Va aproximadamente de los 400-10 cm^{-1} y se encuentra adyacente a la región de microondas, posee una baja energía y puede ser usado en espectroscopia rotacional.

Hasta la fecha, la gran mayoría de sus aplicaciones analíticas han restringido al uso de una parte de la región del infrarrojo medio comprendido de los 4000 a los 400 cm^{-1} [Skoog y Leary, 1995].

Para que ocurra la absorción en el infrarrojo, las vibraciones moleculares deben producir un cambio en el momento dipolar del enlace. Es decir, mientras más polar sea el enlace será mayor la intensidad de su absorción y viceversa. Se observarán bandas intensas para las vibraciones entre dos átomos que tengan mucha diferencia en sus electronegatividades tales como el C=O. Las vibraciones simétricas que ocurren sobre un centro de simetría molecular son inactivas en el infrarrojo, porque el enlace no es polar. Entonces, grupos como el C-C, C=C, O-O son semi-simétricos (los dos átomos son iguales) y mostrarán absorciones débiles o muy débiles; si la simetría es perfecta no se observará ninguna señal. Por contraste, se observarán absorciones fuertes (y deben ser diagnósticas) para grupos como C-O, C-N, O-H, N-H, C=O, etc. Cada enlace diferente que cubra estas características dará lugar a una o varias señales en el infrarrojo, debidas al estiramiento y a la deformación. La intensidad de la absorción depende de la diferencia de cargas entre los átomos del enlace. Un enlace polar absorberá fuertemente, uno poco polar débilmente, dos átomos con carga idéntica no absorben. La posición de la absorción depende del tipo de átomos que forman el enlace, de la fuerza de éste y del cambio ocurrido (estiramiento o deformación) [Skoog y Leary, 1995].

El FT-IR utiliza un interferómetro para medir un espectro. La luz infrarroja va desde la fuente incandescente hasta un separador de luz luminoso, parte de la luz atraviesa el separador y parte es reflejada. La luz reflejada incide sobre un espejo estacionario, mientras que la transmitida incide sobre un espejo que se mueve a velocidad constante. Los rayos retornan de los espejos al separador y crean un modelo de interferencia denominado interferograma, el cual llega al detector. El interferograma se encuentra en el dominio de tiempo, que corresponde a la energía registrada por el detector cuando se mueve el espejo a través de la señal. Un algoritmo computacional estándar llamado transformada de Fourier, convierte el dominio de tiempo en el espectro de dominio de frecuencia, el cual permite ver la intensidad de la absorción como una función de la frecuencia (o de longitud de onda) [Rouessac y Rouessac, 2003; Sócrates, 1994; Wade, 2004].

2.6.4 Espectroscopía UV-vis

La región del espectro de absorción denominada UV-vis, engloba las radiaciones perceptibles por el ojo humano. Esta técnica aporta poca información estructural, sin embargo, presenta multitud de aplicaciones en análisis cuantitativo. El cálculo de concentraciones en esta región, mediante la Ley de Lambert-Beer, constituye la base de los métodos designados bajo el término general de colorimetría. Las bandas de espectro UV son anchas debido a que incluyen la estructura fina de transiciones vibracionales y rotacionales de menor energía. Los hidrocarburos saturados son transparentes en el UV cercano. Los compuestos orgánicos (cetonas, aminas, derivados nitrados, entre otros) responsables de la absorción en la región UV-vis se denominan grupos cromóforos [Misra y Dubinskii, 2002].

2.7 Simulación molecular

El modelado y simulación molecular son términos generales que engloban métodos teóricos y técnicas computacionales para imitar el comportamiento de moléculas y predecir la estructura tridimensional así como las propiedades fisicoquímicas de las moléculas. Los métodos de simulación molecular son usados para investigar la estructura, dinámica y termodinámica de sistemas inorgánicos, biológicos y poliméricos. Esta técnica permite reducir tiempos y costos de investigación cuando se busca realizar síntesis de compuestos con posibilidades de aplicación en diversas áreas químicas y biológicas. Se ha demostrado que el modelado molecular es una poderosa herramienta en la caracterización de una gran cantidad de sistemas químicos. Muchas propiedades se pueden calcular con una precisión que es comparable a la capacidad experimental. La simulación de propiedades es especialmente importante para sistemas que son difíciles de estudiar experimentalmente, debido a su limitada solubilidad en solventes comunes. En otros casos, el experimento en sí mismo, puede ser difícil ya sea debido a la sensibilidad para preparar la muestra o a las ambigüedades en la interpretación de resultados [Derecskei y Derecskei-Kovacs, 2006].

Accelrys Materials Studio es un programa computacional de modelado y simulación, diseñado principalmente para líneas de investigación en química, materiales y desarrollo de farmacéuticos. Provee soluciones y aplicaciones para el estudio de materiales, estructura de cristales y procesos de cristalización, catálisis, propiedades de polímeros y relación estructura – actividad de las moléculas [www.accelrys.com]. Accelrys Materials Studio ha sido muy empleado para la simulación de biomacromoléculas , así como para biopolímeros [Wang y Somasundaran, 2005].

CAPITULO III

METODOLOGÍA

3.1 Reactivos

Celulosa de *Eucalyptus saligna*. (Cellulose, $(C_6H_{10}O_5)_n$)

Facilitada por la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera. Polvo blanco, inodoro, soluble en ácido sulfúrico del 70-75%, ácido clorhídrico al 44%, ácido fosfórico al 85%. Se muestra en la Fig. 3.1. Tiene peso molecular variable con un valor mínimo de $n=200$. Es biodegradable, no ocasiona daños fisiológicos. Se conserva bien tapado, en un lugar seco a temperatura ambiente. Se emplea sin previo tratamiento.

Ácido carmínico. (Carminic acid, $C_{22}H_{20}O_{13}$, No. CAS 1260-17-9. C.I. 75470, E-120).

Suministrado por Sigma-Aldrich, peso molecular $M_w=492.39$ g/gmol. Pigmento de color rojo carmín (Fig. 3.2). Inodoro, soluble en agua, alcoholes y ácido sulfúrico diluido. Se utiliza tal y como se recibe, sin tratamiento previo.

Ácido clorhídrico (Chlorohydric acid, concentrado, HCl, No. CAS 7647-01-0)

Líquido incoloro o ligeramente amarillo de olor penetrante. Densidad 1190 kg/m³ (solución 37%); Masa molar: $36,46$ g/mol. Punto de fusión: 247 K (-26 °C) Punto de ebullición: 321 K (48 °C). Sus vapores son irritantes a los ojos y membranas mucosas. Es soluble en agua, desprendiendo calor. Es corrosivo de metales y tejidos. La solución utilizada se prepara en agua destilada al 70% v/v.

Hexano (Hexane, C_6H_{14} , No. CAS 110-54-3)

Líquido incoloro con un olor parecido al del petróleo. Masa molar: 86.17 g/mol. Densidad 0.66 g/ml (a 20 °C). Punto de ebullición: 69 °C. Punto de fusión: -95.6 °C. Es un compuesto altamente inflamable, causa irritación de la piel y los ojos y puede ocasionar daño pulmonar al ser ingerido o inhalado. Se emplea sin tratamiento previo.

Acetona (Acetone, C_3H_6O , CH_3COCH_3 , No. CAS 67-64-1)

Líquido incoloro, de olor característico, volátil, altamente inflamable y sus vapores son más pesados que el aire. Masa molar: 58.08 g/mol. Punto de ebullición: 56.5 °C. Punto de fusión: -94 °C. Densidad: 0.788 g/ml (a 25 °C), 0.7972 g/ml (a 15 °C). Miscible con agua, alcoholes, cloroformo, dimetilformamida, aceites y éteres. Este compuesto se ha utilizado por muchos años como disolvente y se ha informado de muy pocos efectos tóxicos, por lo que ha sido considerado como un producto poco peligroso, en este sentido. Se utiliza sin previo tratamiento.

El presente trabajo se desarrolló en el edificio “O” en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera.

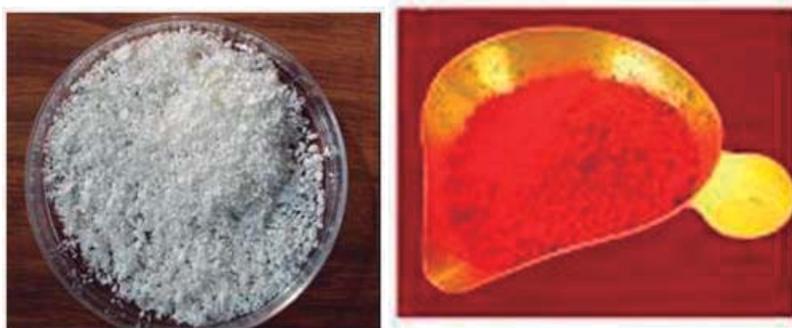


Fig. 3.1 Celulosa de *Eucalyptus saligna* **Fig.3.2** Ácido carmínico

3.2 Obtención de películas de celulosa

Películas de celulosa

Se formaron películas de celulosa por dos procesos, por dilución ácida y acuosa a diferentes concentraciones por evaporación del solvente.

Disolución ácida (Cel/ac)

1. Para formar las películas se preparó una disolución ácida de celulosa (Fig. 3.3) en cinco concentraciones en 60 ml de HCl al 70%, bajo agitación magnética a 600 rpm por cinco tiempos diferentes (Tabla 3.1), posteriormente se realizó el vaciado de las soluciones en una caja de Petri.
2. Las muestras de llevaron a secado, se introducen a la estufa para evaporar el solvente y se formen las películas. Se crearon dos series de películas para secar a 65°C; éstas se dejaron en el proceso de secado hasta obtener un peso constante.
3. Para determinar peso constante se monitoreó el peso de las muestras por intervalos de tiempo. Después de 24 horas en la estufa se sacó cada muestra, se dejó en desecador por una hora aproximadamente hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesó la muestra en balanza analítica (W_0). Se introdujeron nuevamente las muestras por una hora en la estufa, se enfriaron en desecador y determinaron sus pesos (W_i). Se compararon los pesos hasta que $W_0 - W_i \leq 0.001$, sino cumplía la tolerancia, se introducían las muestras a la estufa y se determinaban sus pesos repitiendo el procedimiento antes descrito.
4. Las muestras secas se conservaron en cajas Petri dentro del desecador.



Fig. 3.3 Disolución ácida de celulosa

Se realizaron pruebas con tiempo de disolución y cantidad de celulosa diferentes, las cuales se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 3.1 Concentración de celulosa y tiempo de disolución para la formación de películas en solución ácida.

CELULOSA % wt	TIEMPO DE DISOLUCIÓN (h)
0.3	24
0.6	24
0.7	24
0.7	5
1.4	5

Disolución acuosa (Cel/acu)

1. Para formar las películas de celulosa en disolución acuosa se preparó una disolución de celulosa (Fig. 3.4) en dos concentraciones en 100 ml de agua, bajo agitación magnética a 600 rpm por 24 horas (Tabla 3.2).
2. Para la formación de la película se utilizó un embudo Büchner, en el cual se coloca un papel filtro de rápido drenado y sobre éste se vacía la muestra de la cual se quiere formar la película, haciendo succión por una bomba de vacío.
3. Las muestras de llevaron a secado, se introducen a la estufa para evaporar el solvente y se formen las películas. Se crearon dos series de películas para secar a 50°C; éstas se dejaron en el proceso de secado hasta obtener un peso constante.
4. Para determinar peso constante se monitoreó el peso de las muestras por intervalos de tiempo. Después de 24 horas en la estufa se extrajo cada muestra, se dejó en desecador por una hora aproximadamente hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesó la muestra en balanza analítica (W_0). Se introdujeron nuevamente las muestras por una hora en la estufa, se enfriaron en desecador y determinaron sus pesos (W_i). Se compararon los pesos hasta que $W_0 - W_i \leq 0.001$, sino cumplía la tolerancia, se

introducían las muestras a la estufa y se determinaban sus pesos repitiendo el procedimiento antes descrito.

5. Las muestras secas se conservaron en cajas Petri dentro del desecador.



Fig. 3.4 Disolución acuosa de celulosa

Tabla 3.2 Concentración de celulosa y tiempo de disolución para la formación de películas en solución acuosa.

CELULOSA % wt	TIEMPO DE DISOLUCIÓN (h)
0.5	24
1	24

3.3 Obtención de nanopartículas de celulosa (Nano)

Para la obtención de nanopartículas se utilizó el método de emulsión inversa (Fig. 3.5) utilizando hexano como fase continua y los SPAN 80 y 85 como emulsificantes.

1. Para formar las nanopartículas de celulosa se requirió un reactor de vidrio de 500 mL y de un agitador Stirrer BDC 2002 Compact Digital con aspas de teflón. La temperatura de reacción fue de $55 \pm 2^\circ\text{C}$ y una velocidad de agitación de 600rpm.
2. Se preparó la fase continua (acuosa) con 100 mL de hexano con 0.5 g de SPAN 80 y 85 como emulsificantes y la fase discontinua con 0.5 g de celulosa en una disolución ácida con 20 mL de HCl al 70%.

3. La fase continua se puso en agitación magnética a una velocidad de 600 rpm y se adicionó la discontinua, se mantuvo la temperatura a $55\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 3 horas y se dejó enfriar hasta $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ sin suspender la agitación.
4. El producto se lavó con 5 volúmenes de acetona de 40 mL cada uno y se llevó a centrifugación a una centrífuga refrigerada marca Hermile modelo Z400K con la finalidad de eliminar el exceso de ácido y surfactantes y por consecuencia, purificar las nanopartículas y mejorar el rendimiento.
5. Las nanopartículas se conservaron en acetona.



Fig. 3.5 Método de emulsión inversa

3.4 Integración del ácido carmínico (AC) a las matrices de celulosa

3.4.1 Películas de celulosa y AC (Cel/AC)

El AC se integró a las películas por dos métodos inmersión (Cel/ACIm) *e in situ* (Cel/ACIs), y se utilizaron concentraciones porcentuales en peso de AC siguientes: 0.05, 0.1, 0.2 y 0.5.

Integración por inmersión del AC a películas ácidas y acuosas (Cel/ac/ACIm) y (Cel/acu/ACIm)

1. La integración del AC por inmersión (Fig. 3.6) se realizó a partir de una solución de AC en agua destilada en las concentraciones arriba especificadas, la cual se mantuvo en agitación magnética durante 20 min a 600 rpm.
2. Las películas obtenidas por disolución ácida y acuosa completamente secas, se fraccionaron en pequeños trozos de 2.5 X 2 cm.
3. Las películas fueron inmersas en 80 ml de las soluciones de AC, la inmersión se realizó en un Inmersor DIGITAL E-ANT1 Marca SK-UV, las condiciones de inmersión fueron las siguientes:

Velocidad de Inmersión	10 mm/s
Tiempo de residencia	10 seg
Repeticiones	3
Desplazamiento	7 cm

4. Las películas se colocan en un portaobjetos y se dejan secar en una estufa a $50 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas.



Fig. 3.6 Integración por inmersión de las películas de celulosa

Integración *in situ* del AC a películas ácidas y acuosas (Cel/ac/ACIs) y (Cel/acu/ACIs)

El ácido carmínico se integró durante la disolución previa a la formación de las películas por disolución ácida y acuosa.

1. Para las películas obtenidas por disolución ácida con AC (Fig. 3.7), se preparó una solución con 1.4 wt% de celulosa en 60 ml de HCl al 70%
2. El AC previamente disuelto en las concentraciones previamente especificadas, se vertió en la solución de celulosa, se mantuvo bajo agitación magnética a 600 rpm durante 5 horas.
3. Las muestras de llevaron a secado a 65°C, se introducen a la estufa para evaporar el solvente y se formen las películas, éstas se dejaron en el proceso de secado hasta obtener un peso constante.
4. Para la formación de las películas por disolución acuosa con AC (Fig. 3.8), se preparó una disolución acuosa con 1 wt% de celulosa.
5. El AC se disuelve en 80 mL de agua, en las concentraciones indicadas previamente, se mantuvo bajo agitación magnética a 600 rpm durante 24 h a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.
6. Para la formación de la película se utilizó un embudo Büchner, en el cual se coloca un papel filtro de rápido drenado, y sobre éste se vacía la muestra de la cual se quiere formar la película, haciendo succión por una bomba de vacío.
7. Las muestras de llevaron a secado, se introducen a la estufa para evaporar el solvente y se formen las películas. Se crearon dos series de películas para secar a 50°C; éstas se dejaron en el proceso de secado hasta obtener peso constante.

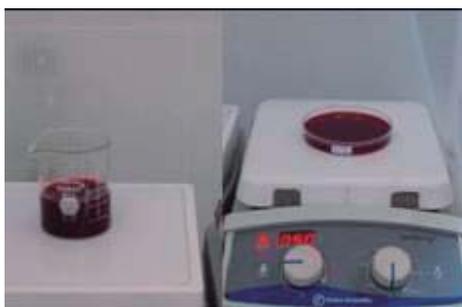


Fig.3.7 Integración in situ disolución ácida



Fig.3.8 Integración in situ disolución acuosa.

3.4.2 Nanopartículas de celulosa y AC (Nano/AC)

El AC se integró a las nanopartículas por dos métodos inmersión (Fig. 3.9) *e in situ* (Fig. 3.10), y se utilizaron las siguientes concentraciones de AC 0.05%, 0.1%, 0.2% y 0.5 wt%

Integración por inmersión (Nano/ACIm)

1. El AC se disolvió en 30 ml de acetona en las concentraciones antes mencionadas, la solución se mantuvo bajo agitación magnética durante 20 min.
2. Las nanopartículas de celulosa se vertieron en la solución de AC y se mantuvieron en agitación magnética durante 20 min.
3. Las nanopartículas con AC se almacenaron en tubos falcon.



Fig. 3.9 Integración por inmersión del AC a las nanopartículas (Nano/ACIm)

Integración *in situ* (Nano/ACIs)

1. El AC se integró a la solución de celulosa previamente a la formación de las nanopartículas, manejando las concentraciones antes mencionadas.
2. La solución Celulosa-HCl-AC se mantuvo en agitación constante durante 20 minutos.
3. Para obtener las Nano/AC, se llevó a cabo el proceso de emulsión inversa bajo las mismas condiciones para la formación de nanopartículas de celulosa puras.

4. Las nanopartículas se lavaron con 5 volúmenes de acetona de 40 ml cada uno, y se llevó a centrifugación a una centrífuga refrigerada marca Hermile modelo Z400K con la finalidad de eliminar el exceso de ácido y surfactantes y por consecuencia, purificar las nanopartículas y mejorar el rendimiento.
5. Las nanopartículas se conservaron en acetona en tubos falcon.



Fig. 3.10 Integración in situ del AC a las nanopartículas de celulosa (Nano/ACIs)

3.5 Evaluación de la actividad del AC ante condiciones variables de humedad y temperatura.

Las matrices obtenidas (Cel/ac/ACIs, Cel/acu/ACIs, Nano/ACIs) se colocaron bajo diferentes condiciones de temperatura y humedad, para determinar la estabilidad de las mismas y principalmente el comportamiento del ácido carmínico (AC). Las condiciones manejadas fueron: 25°C – 65%HR, 37°C – 65%HR y 37°C – 75%HR. Las matrices estuvieron bajo estas condiciones durante 7 días y posteriormente se realizó UV-vis y luminisidad, para determinar cambios en la estabilidad del AC.

3.6 Técnicas de caracterización

Los materiales obtenidos de forma pura así como una vez integrado el ácido carmínico, se analizaron con técnicas como:

Espectroscópicas (Espectroscopía por Infrarrojo y UV-vis), microscópicas (Microscopía de Barrido y de Fuerza Atómica), determinación de color, para valorar la integración del AC en las películas y nanopartículas de celulosa. Se determinó el rendimiento para estimar la eficiencia del proceso de obtención de las mismas.

3.6.1 Rendimiento de nanopartículas

Además de la caracterización morfológica y estructural, se determinó el % de rendimiento, para lo cual se colocó un crisol a peso constante y sobre éste se vertió la muestra dejándose secar a 30°C por 24 horas. Se pesó y se hicieron los cálculos correspondientes.

3.6.2 Determinación de color

La determinación de color se realizó en un colorímetro Hunter Lab Color Flex (Fig. 3.11).



Fig.3.11 Colorímetro Hunter Lab

3.6.3 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Dentro de la caracterización morfológica se utilizó el microscopio de fuerza atómica Quesant, con punta de silicio en modo de no contacto (Fig. 3.12).



Fig. 3.12 Microscopio de Fuerza Atómica

3.6.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se realizó utilizando un equipo Bruker JSM-6400 Scanning-Microscope (Fig. 3.13).



Fig. 3.13 Microscopio Electrónico de Barrido

3.6.5 Espectroscopía Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

La caracterización estructural por FTIR se llevó a cabo utilizando un equipo Bruker Modelo Tensor 27 (Fig. 3.14), en el intervalo del infrarrojo medio ($4000-400\text{ cm}^{-1}$).



Fig. 3.14 Espectroscopio Infrarrojo por Transformada de Fourier

3.6.6 Espectroscopía UV-vis

La caracterización por UVvis se realizó bajo un equipo Lambda 40, de Perkin Elmer (Fig. 3.15), en un rango de longitud de onda de 200 – 600 nm.



Fig. 3.15 Espectroscopio UV-vis Lambda 40

3.7 Simulación molecular de Celulosa y AC

Se utilizó el software Materials Studio 5.0 desarrollado por Accelrys Inc para representar los modelos de AC y cadenas poliméricas de celulosa. Se analizaron modelos de 1 a 200 unidades monoméricas de celulosa y las interacciones moleculares que se generan en el sistema AC-Celulosa. Las estructuras más estables se consideraron en la optimización de la geometría espacial a la mínima energía.

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención de películas de celulosa

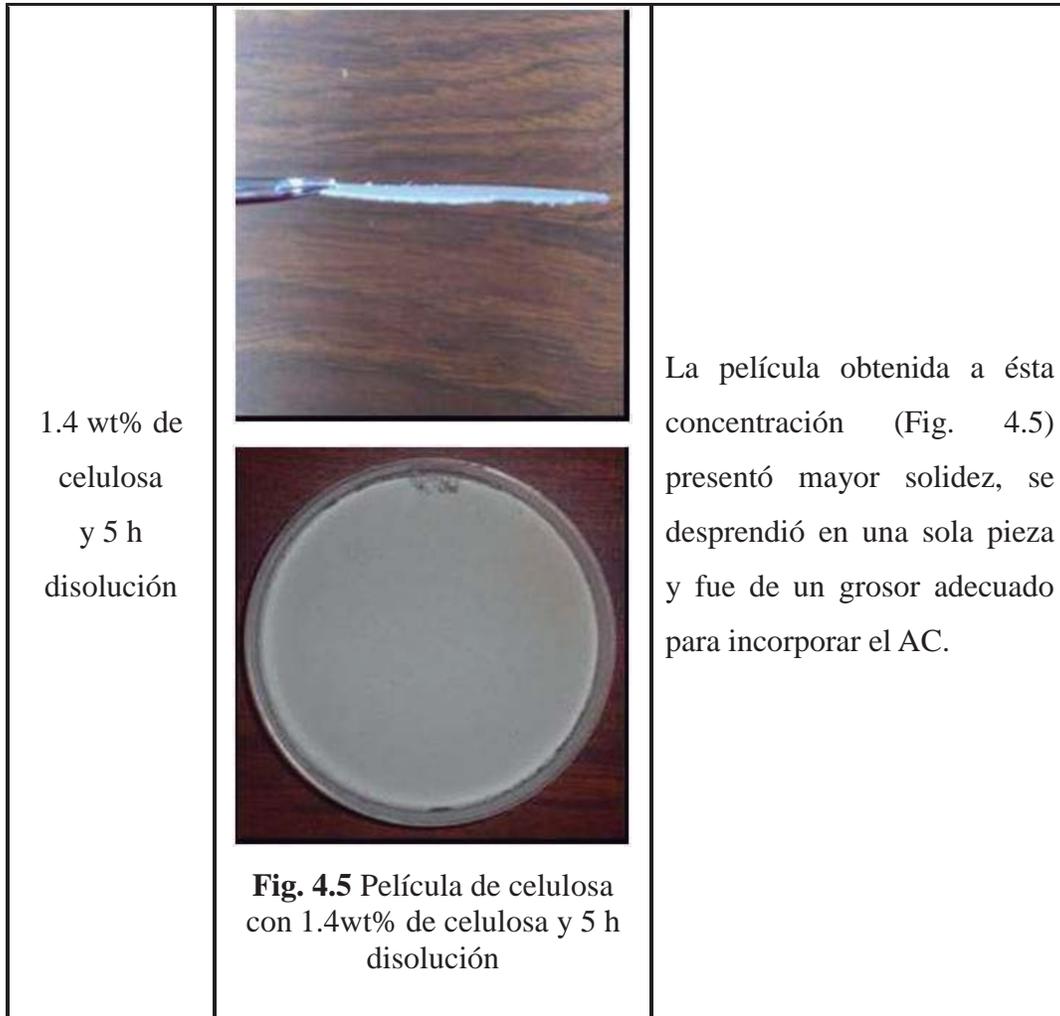
Disolución ácida

Las pruebas para determinar el mejor medio de disolución de la celulosa aportaron los siguientes resultados:

Tabla 4.1 Características de las películas obtenidas por disolución ácida.

Condiciones disolución		Observaciones
0.3 wt% de celulosa y 24 h disolución	 <p data-bbox="500 1318 912 1423">Fig. 4.1 Película de celulosa con 0.3wt% de celulosa y 24 h disolución</p>	La película (Figura 4.1) quedó adherida a la caja de Petri sin poder desprenderse debido a su grosor, por lo cual no cuenta con las características esperadas.
0.6 wt% de celulosa y 24 h disolución	 <p data-bbox="500 1843 912 1885">Fig. 4.2 Película de celulosa</p>	Se formó una película (Figura 4.2) con mayor grosor, sin embargo, solamente se desprendió de ciertas partes de la caja de Petri, además fué quebradiza. No cumple con lo deseado.

	con 0.6wt% de celulosa y 24 h disolución.	
0.7 wt% de celulosa y 24 h disolución	 <p>Fig. 4.3 Película de celulosa con 0.7% de celulosa y 24 h disolución</p>	<p>Película (Figura 4.3) con mejor grosor y pudo desprenderse por completo; pero fue muy quebradiza, debido a que la disolución ácida redujo el tamaño de fibra de forma muy considerable, por lo cual se optó por reducir el tiempo de disolución.</p>
0.7 wt% de celulosa y 5 h disolución	 <p>Fig. 4.4 Película de celulosa con 0.7wt% de celulosa y 5 h disolución</p>	<p>Esta película (Figura 4.4) cumplió con las características deseadas, se logró desprender en una sola pieza y fue de un grosor adecuado.</p>



Disolución acuosa

Las películas formadas por este método presentaron las características mostradas en la tabla 4.2.

Tabla 4.2 Características de las películas obtenidas por disolución acuosa.

Condiciones		Observaciones
0.5 wt% de celulosa y 24 h disolución	 <p data-bbox="521 873 927 978">Fig. 4.6 Película con 0.5wt% de celulosa obtenida por disolución acuosa</p>	<p data-bbox="951 554 1312 972">La película (Fig. 4.6) presentó heterogeneidad en cuanto a su grosor, siendo los bordes los más delgados y por lo tanto débiles, su manipulación es posible. Presentó cierta rugosidad y blancura.</p>
1 wt% de celulosa y 24 h disolución	 <p data-bbox="521 1497 927 1602">Fig. 4.7 Película con 1wt% de celulosa obtenida por disolución acuosa</p>	<p data-bbox="951 1152 1312 1570">La película (Fig. 4.7) tuvo un mayor grosor, es homogénea incluso en los bordes, pudo desprenderse con mayor facilidad, y es manejable. Presentó mayor rugosidad que la anterior y una blancura similar.</p>

4.2 Obtención de nanopartículas de celulosa (Nano)

Las nanopartículas obtenidas presentan un aspecto polvoso y de color blanco. En la figura 4.8 se puede observar tanto en medio líquido como seco.



Fig. 4.8 Nanopartículas de celulosa en solución y en seco

4.3 Integración del ácido carmínico (AC) a las matrices de celulosa

4.3.1 Películas de celulosa y AC (Cel/AC)

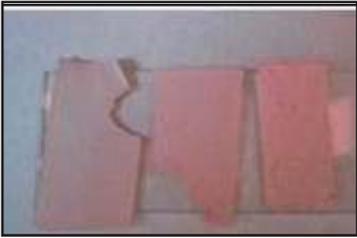
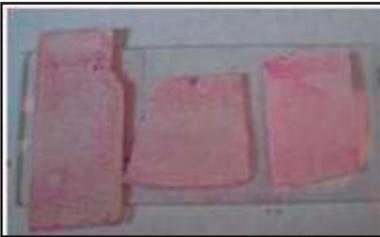
La integración del ácido carmínico se realizó a las películas obtenidas tanto por disolución ácida como acuosa. Esta integración se realizó solamente a las películas obtenidas con las mejores características las cuales fueron las que se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 4.3 Condiciones de obtención de películas por disolución ácida y acuosa con las mejores características.

PELÍCULA	MEJORES CONDICIONES
Disolución ácida	1.4 wt% de celulosa y 5 h disolución
Disolución acuosa	1 wt% de celulosa y 24 h disolución

Integración por inmersión (Tabla 4.4 y 4.5)

Tabla 4.4 Películas disolución ácida + AC Inmersión

<u>Disolución ácida</u>		
[] DE AC		OBSERVACIONES
0.05wt%	 <p>Fig. 4.9 Cel/ac/ACIm 0.05wt%</p>	La película inmersa en la solución con ácido carmínico, fue quebradiza, dificultando su manejo. El AC se integró, dando como resultado películas de un tono rosa pálido, tenue y heterogéneo.
0.1wt%	 <p>Fig. 4.10 Cel/ac/ACIm 0.1wt%</p>	Con 0.1% wt la película fue muy frágil al encontrarse húmeda por la solución, y su manejo fue difícil. La coloración obtenida fue más intensa que la anterior y heterogénea.
0.2wt%	 <p>Fig. 4.11 Cel/ac/ACIm 0.2wt%</p>	La película fue inconsistente al impregnarse con la solución de AC. Al duplicarse la concentración el colorante se integró de mejor manera al anterior y se observaron nuevamente espacios con menor tinción. El color

		<p>obtenido fue rosa y en ciertas áreas se observaba un tono más rojizo.</p>
<p>0.5wt%</p>	 <p>Fig. 4.12 Cel/ac/ACIm 0.5wt%</p>	<p>En cuanto a la concentración más alta de AC , éste se integró con mayor homogeneidad y las películas tomaron un color rojo más intenso, su manejo fue muy delicado debido a que una vez inmerso el colorante, se debilitaron las películas</p>

En la siguiente figura se observan las películas con las diferentes concentraciones de AC manejadas, se puede visualizar la tonalidad obtenida, así como la distribución del AC.

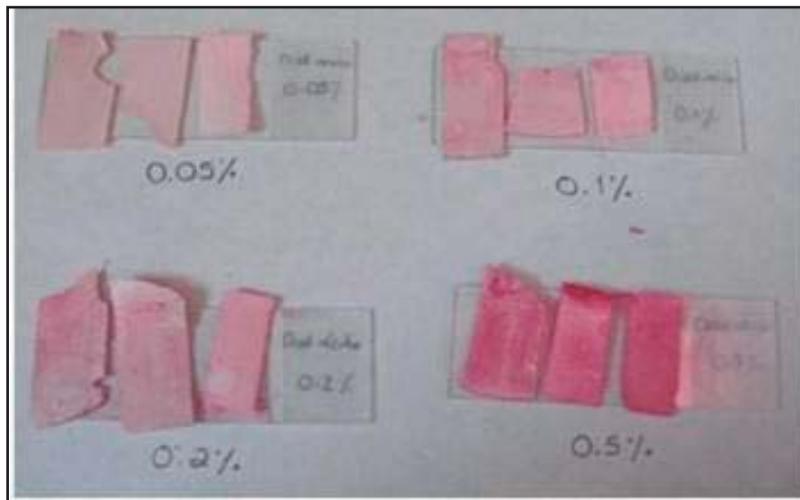
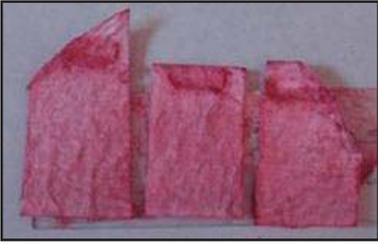


Fig. 4.13 Cel/ac/ACIm a diferentes concentraciones

Tabla 4.5 Películas disolución acuosa + AC Inmersión

<u>Disolución acuosa</u>		
[] DE AC		OBSERVACIONES
0.05wt%	 <p>Fig.4.14 Cel/acu/ACIm 0.05wt%</p>	La película una vez inmersa en la solución de AC mantuvo su estructura, no fue frágil ni se fraccionó y obtuvo una coloración rosa muy tenue.
0.1wt%	 <p>Fig.4.15 Cel/acu/ACIm 0.1wt%</p>	La película se mantuvo entera. La coloración fue ligeramente más intensa que en la concentración anterior. La distribución del colorante se observó más homogénea que en las película por disolución ácida.
0.2wt%	 <p>Fig. 4.16 Cel/acu/ACIm 0.2wt%</p>	Al realizar la inmersión la película se mantuvo íntegra, se observó una mayor coloración, y con una distribución homogénea (tono acentuado donde la película se sujetó del inmersor).

<p>0.5wt%</p>	 <p>Fig. 4.17 Cel/acu/ACIm 0.5wt%</p>	<p>A una concentración más alta, la película no fue frágil. Y mostró una tonalidad rojiza y con mayor intensidad a los anteriores.</p>
---------------	---	--

En la figura siguiente se observan las películas para las diferentes concentraciones usadas, su coloración, intensidad y distribución.

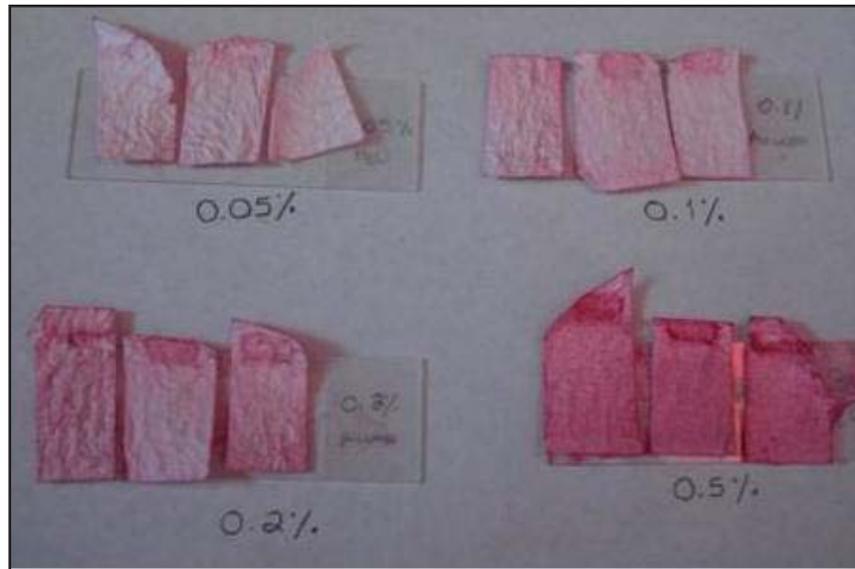


Fig. 4.18 Cel/acu/ACIm a las diferentes concentraciones.

Integración *in situ* (Tabla 4.6 y 4.7)

Tabla 4.6 Películas disolución ácida + AC *In situ*

<u>Disolución ácida</u>		
[] DE AC		OBSERVACIONES
0.05wt%	 Fig. 4.19 Cel/ac/ACIs 0.05wt%	<p>La película presentó una coloración rojiza más intensa comparada con la integración por inmersión. Esta fue ligeramente quebradiza, sin embargo, un poco más estable que la obtenida por inmersión a la misma concentración.</p>
0.1wt%	 Fig. 4.20 Cel/ac/ACIs 0.1wt%	<p>La película tuvo un color rojo más intenso que la anterior y la distribución del AC fue más homogénea, siendo quebradiza igual que la anterior.</p>
0.2wt%		<p>De acuerdo a la concentración, ésta película tuvo una tonalidad rojiza más intensa que las anteriores, con algunas</p>

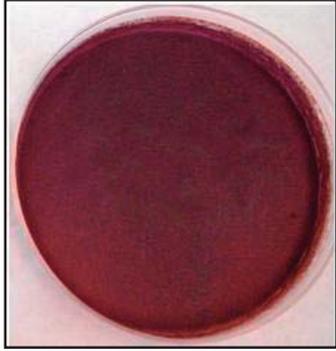
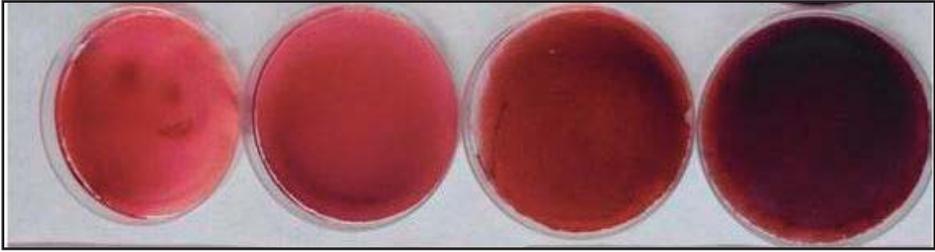
	 <p>Fig. 4.21 Cel/ac/ACIs 0.2wt%</p>	<p>partes tendiendo hacia púrpura, la distribución del AC no del todo homogénea y en cuanto a su estabilidad estructural, fue igual de quebradiza que las anteriores.</p>
<p>0.5wt%</p>	 <p>Fig. 4.22 Cel/ac/ACIs 0.5wt%</p>	<p>La película con 0.5 wt% tuvo la tonalidad más intensa, la coloración tendió del rojo al púrpura, la distribución del AC fue homogénea. La película es menos quebradiza que las anteriores.</p>
<p>En la figura siguiente se pueden observar las películas obtenidas a las diferentes concentraciones, la coloración, intensidad y distribución del AC.</p>		
 <p>Fig. 4.23 Cel/ac/ACIs a las diferentes concentraciones (0.05, 0.1, 0.2 y 0.5wt% de izquierda a derecha)</p>		

Tabla 4.7 Películas disolución acuosa + AC *In situ*

<u>Disolución acuosa</u>		
[] DE AC		OBSERVACIONES
0.05wt%	 <p>Fig. 4.24 Cel/acu/ACIs 0.05wt%</p>	La película presenta una estructura sólida, es firme y no quebradiza como en el caso de disolución ácida. La coloración obtenida es un rosa tenue, la distribución del AC es homogénea, sin embargo, la tonalidad es menor comparada con la película por disolución ácida en la misma concentración de AC.
0.1wt%	 <p>Fig. 4.25 Cel/acu/ACIs 0.1 wt%</p>	Esta película de igual manera a la anterior no es frágil. La tonalidad es un rosa más intenso que la película con 0.05% wt, y la distribución del AC es homogénea.
0.2wt%	 <p>Fig. 4.26 Cel/acu/ACIs</p>	En cuanto a la película por disolución acuosa al 0.2wt% de AC, es de forma y apariencia similar a la película sin AC. El colorante se integró de forma homogénea, dando una coloración rosa intenso.

	0.2wt%	
0.5wt%	 <p>Fig. 4.27 Cel/acu/ACIs 0.5wt%</p>	<p>Con 0.5wt% de AC la película presentó las mismas condiciones en cuanto a estructura y solidez que las anteriores, la integración del colorante fue homogénea, se presentó un color rojizo y con una intensidad mucho mayor a las anteriores.</p>

En la figura siguiente se observan las cuatro películas obtenidas con las diferentes concentraciones de AC.



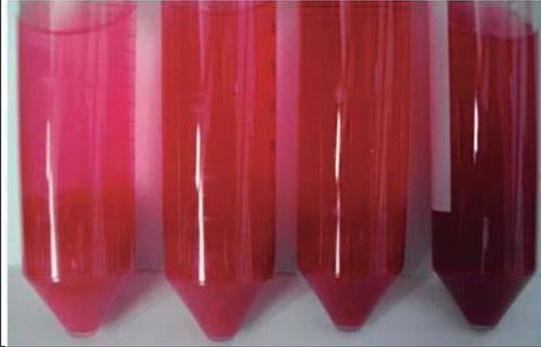
Fig. 4.28 Cel/acu/ACIs a las diferentes concentraciones

4.3.2 Nanopartículas de celulosa y AC (Nano/AC)

Integración por Inmersión (Tabla 4.8)

Tabla 4.8 Nanopartículas + AC Inmersión

[] DE AC		OBSERVACIONES
0.05wt%	 <p>Fig. 4.29 Nano/ACIm 0.05wt%</p>	Una vez integrado el AC, las nanopartículas conservan su consistencia y apariencia; con una tonalidad rojiza; se observan algunas partículas del AC distribuidas en la solución.
0.1wt%	 <p>Fig. 4.30 Nano/ACIm 0.1wt%</p>	En las nanopartículas con 0.1% wt de AC, se aprecia mayor intensidad de color en las nanopartículas, quedando un remanente en el solvente
0.2wt%	 <p>Fig. 4.31 Nano/ACIm 0.2wt%</p>	A concentraciones mayores la tonalidad roja fue más intensa. Se observa que el AC se incorporó a las nanopartículas las cuales mantienen su apariencia. Incrementando la coloración en el sobrenadante.
0.5wt%		Al integrar el AC con la

	 <p>Fig.4.32 Nano/ACIm 0.5wt%</p>	<p>mayor concentración, se observó como se esperaba mayor intensidad de color en las nanopartículas.</p>
 <p>Fig. 4.33 Nano/ACIm a 4 diferentes concentraciones de AC</p>		

Integración *In situ* (Tabla 4.9)

Tabla 4.9 Nanopartículas + AC *In situ*

[] DE AC		OBSERVACIONES
0.05wt%	 <p>Fig. 4.34 Nano/ACIs 0.05wt%</p>	<p>Las nanopartículas con AC <i>in situ</i> muestran una tonalidad rosa, a diferencia del método por inmersión en el solvente no se observa AC y la intensidad del color es menor.</p>
0.1wt%		<p>Las nanopartículas con 0.1wt% muestran mayor intensidad de color que la</p>

	 <p>Fig. 4.35 Nano/ACIs 0.1wt%</p>	<p>concentración anterior, la tonalidad tiende al rojo; sin embargo es notoriamente menor a la misma concentración por el proceso por inmersión.</p>
<p>0.2wt%</p>	 <p>Fig. 4.36 Nano/ACIs 0.2wt%</p>	<p>Con esta concentración, se obtuvieron nanopartículas con una tonalidad rojiza mucho más intensa el AC en el sobrenadante es menor que el remanente observado por inmersión.</p>
<p>0.5wt%</p>	 <p>Fig. 4.37 Nano/ACIs 0.5wt%</p>	<p>Finalmente con la concentración más alta, se obtuvieron nanopartículas con una gran intensidad de color, contrastante a todas las anteriores, la tonalidad obtenida tiende al púrpura.</p>
 <p>Fig. 4.38 Nano/ACIs con 4 diferentes concentraciones de AC</p>		

4.4 Caracterización de muestras

4.4.1 Rendimiento de nanopartículas

El rendimiento obtenido para las nanopartículas de celulosa por emulsión inversa fue de 83.92%

4.4.2 Determinación de color

El método empleado para el análisis de color se basó en la reflexión de la luz, específicamente en el parámetro “L”, el cual mide el grado de luminosidad, y los valores van de 0–100, correspondiendo el 0 para el color negro y el 100 para el blanco perfecto. En la tabla 4.10 se presenta el grado de luminosidad obtenido para las películas por disolución ácida, acuosa, así como nanopartículas.

Tabla 4. 10 Luminosidad de las matrices de celulosa en estado puro y una vez integrado el ácido carmínico.

LUMINOSIDAD (L)						
MATRIZ	EN EDO. PURO	+ AC (wt%)				MÉTODO INTEGRACIÓN AC
		0.05%	0.1%	0.2%	0.5%	
Película disolución Ácida (Cel/ac)	75.34	74.25	68.25	66.17	55.68	Inmersión
		25.39	24.98	19.14	16.85	In situ
Película	83.73	74.9	70.26	57.78	48.62	Inmersión

disolución acuosa (Cel/acu)		74.27	65.51	59.77	47.11	In situ
Nanopartículas (Nano)	77.43	56.62	46.78	33.5	30.7	Inmersión
		73.08	62.63	55.46	44.75	In situ

En el análisis de luminosidad para la integración del AC, al comparar el método de obtención de las películas de celulosa, se advierte que el método *In situ* promueve mayor integración del AC, por lo que los valores son menores, esto se debe a que estas matrices son opacas y con coloración más intensa, a diferencia de las nanopartículas que presentan mayor color por el método de inmersión. Es importante considerar que las muestras (nanopartículas) presentaron AC en el medio sobrenadante; por lo tanto, no se asume que el color sea el total integrado a las nanopartículas.

Por otro lado, al analizar las matrices de celulosa; se observó que las películas obtenidas por disolución ácida, presentaron mayor coloración en los dos métodos de obtención.

4.4.3 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

En las figuras siguientes se muestran la micrografías obtenidas por el análisis de microscopía de fuerza atómica a las nanopartículas. Se puede observar en la figura 4.39 la presencia de una gran cantidad de partículas de color blanco, forma esférica y distribuidas al azar. También existen agregados en forma esférica y elipsoidal.

En la figura 4.40 se muestra la micrografía en 3D de las nanopartículas. Se observan partículas que no fueron aisladas por el tiempo que implicó la evaporación del solvente al momento de depositar la muestra. Existen agregados, los cuales presentan alturas de diferentes intervalos.

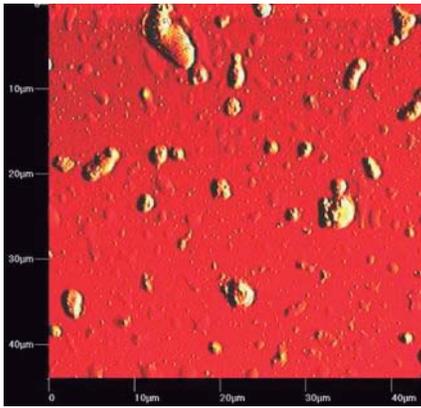


Fig. 4.39 AFM de Nanopartículas de celulosa

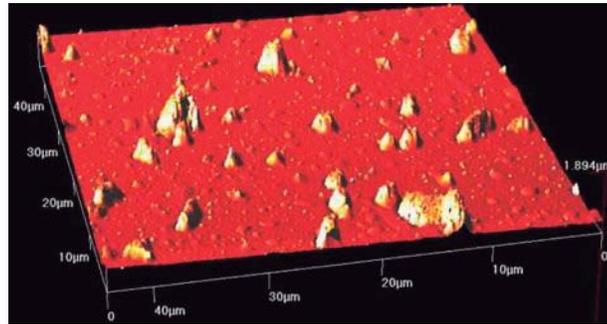


Fig. 4.40 AFM en 3D de nanopartículas de celulosa

En la figura 4.41 se puede estimar el tamaño de las partículas, que van desde aproximadamente 30 nanómetros hasta 1000 nanómetros principalmente.

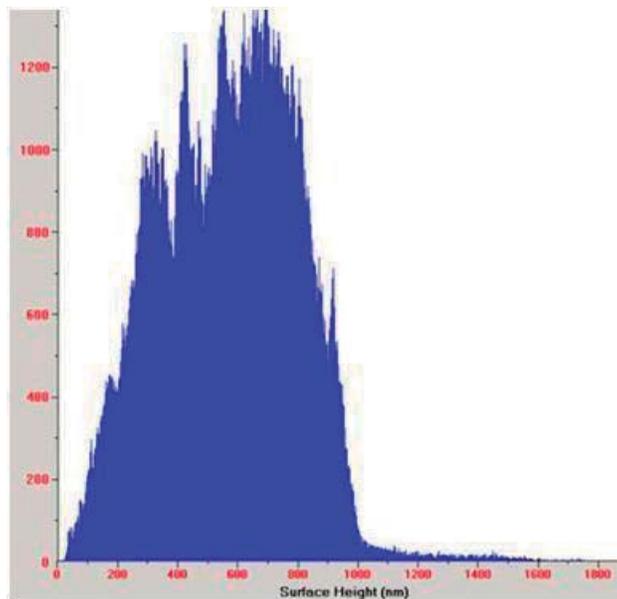


Fig. 4.41 Histograma del tamaño de nanopartículas de celulosa

Es importante destacar que los tamaños mayores son debidos a los agregados de las nanopartículas, para lo cual se realizó un análisis secuencial por esta técnica.

Secuenciación

El análisis secuencial fue realizado en intervalos de 3 minutos y se puede confirmar como lo muestra las figuras superficiales (Fig. 4.42 a 4.45), así como aquellas en tercera dimensión (Fig. 4.46 a 4.49), el crecimiento de los agregados en forma proporcional. Se observa tanto en los agregados blancos como los más oscuros. La visualización se debe a las diferentes profundidades causadas por la rugosidad que arrojan las nanopartículas; sin embargo, a medida que aumenta el tiempo en los agregados, las partículas no se fusionan en una sola y prevalece su forma esférica original. Adicionalmente, es posible observar la presencia de un incremento en la altura de las partículas, respecto a su altura original.

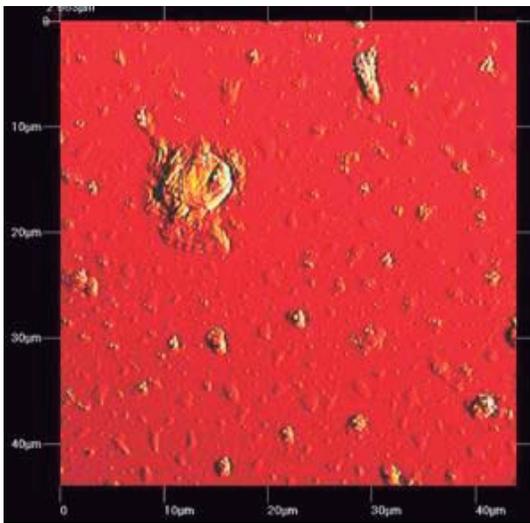


Fig.4.42 AFM en tiempo 0

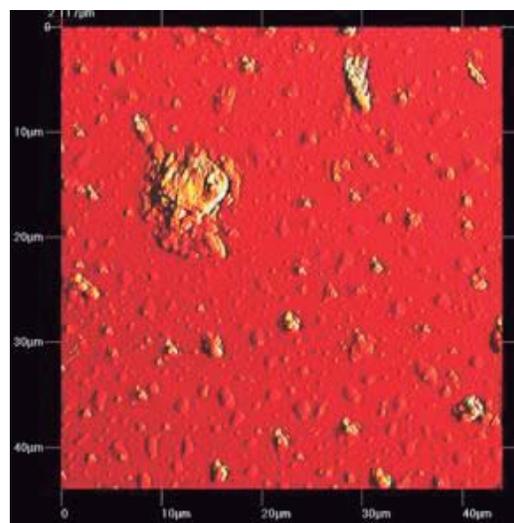


Fig.4.43 AFM en tiempo 1

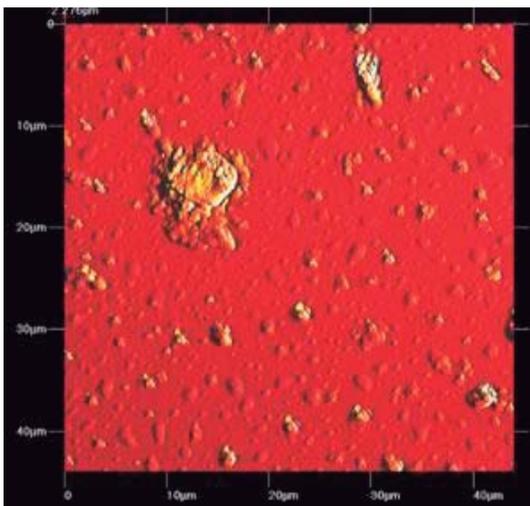


Fig.4.44 AFM en tiempo 2

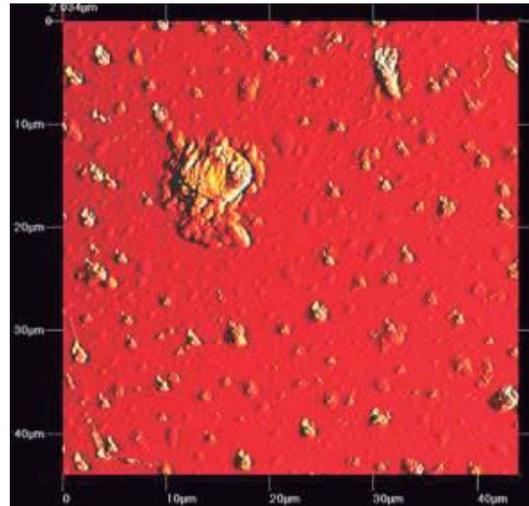


Fig.4.45 AFM en tiempo 3

Secuenciación en 3D

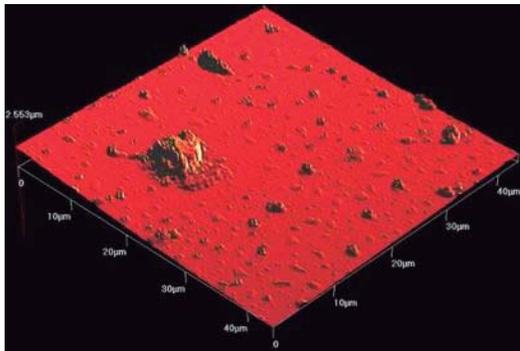


Fig.4.46 3D en tiempo 0

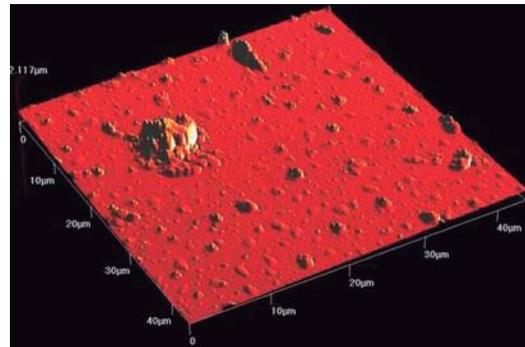


Fig.4.47 3D en tiempo 1

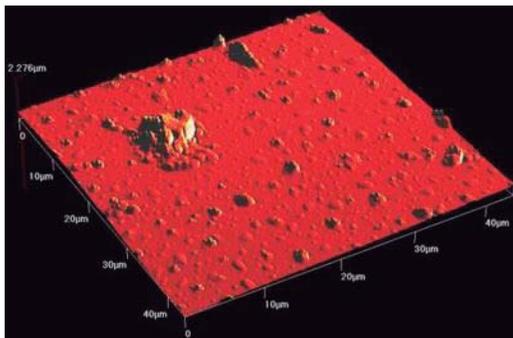


Fig.4.48 3D en tiempo 2

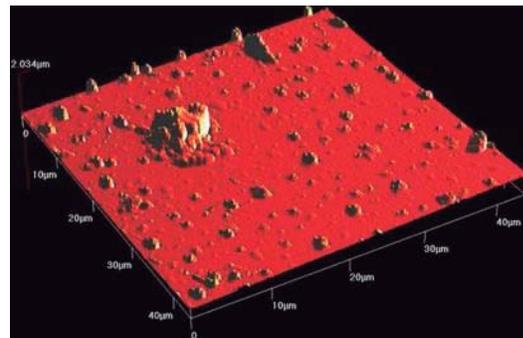


Fig.4.49 3D en tiempo 3

4.4.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Películas de celulosa

Disolución ácida (Cel/ac)

Para las películas de celulosa obtenidas por disolución ácida, se presenta el análisis por SEM (Fig. 4.50), en donde las micrografías a 100X, 300X y 500X muestran la presencia de fibras cortas con continuidad entre ellas generando áreas planas y con una estructura homogénea. Por lo que el ácido promueve la desintegración parcial de las fibras.

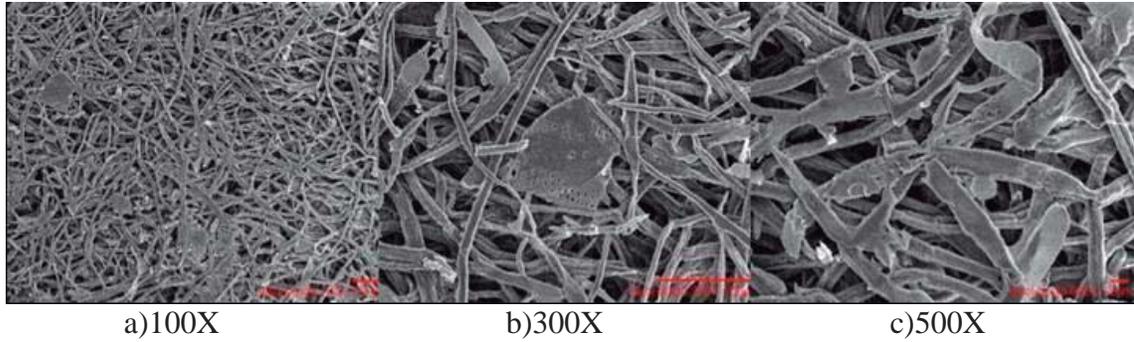


Fig. 4.50 Cel/ac

Disolución acuosa

A diferencia de las obtenidas por disolución ácida, las películas obtenidas por disolución acuosa (Fig. 4.51) muestran fibras largas y rugosas, y se puede observar una separación y distribución al azar.

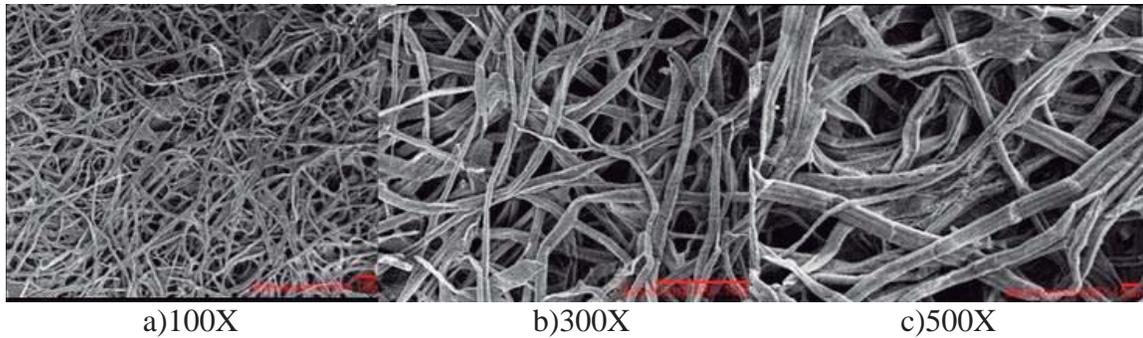


Fig. 4.51 Cel/acu

Películas + Ácido carmínico

Integración por *Inmersión*

Disolución ácida

0.05wt% de AC

El análisis por SEM para el sistema Cel/ac/ACIm con concentración de 0.05 wt% (Fig. 4.52) de ácido carmínico revela a 300X, 750X y 1500X la presencia de fibras cortas lisas con partículas escasas de forma irregular dispersas sobre la superficie de las fibras.

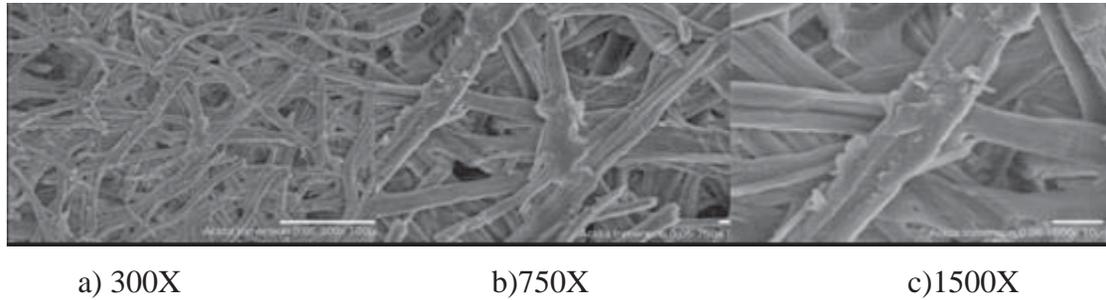


Fig. 4.52 Cel/ac/ACIm 0.05wt%

0.5wt% de AC

En el análisis del mismo sistema Cel/ac/ACIm incrementando la concentración del ácido carmínico a 0.5 wt% (Fig. 4.53) se observa una matriz continua con zonas planas y desintegración de las fibras, incremento en la presencia de las partículas interconectadas a lo largo de la superficie de la matriz. Esto se atribuye a la presencia del AC sin disolver adherido a la superficie.

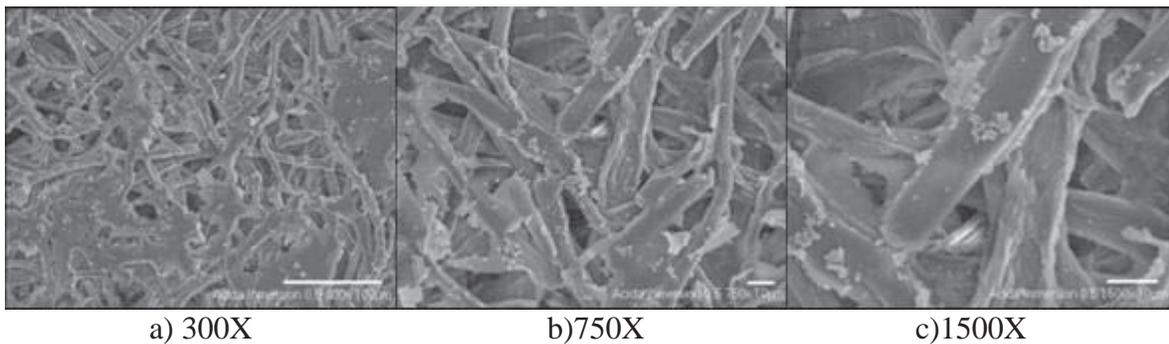


Fig. 4.53 Cel/ac/ACIm 0.5wt%

Disolución acuosa

0.05wt% de AC

Las micrografías en la Figura 4.54 corresponde al sistema Cel/acu/ACIm , con 0.05 % wt del pigmento, donde se puede observar las fibras de celulosa con rugosidad y con partículas pequeñas en su superficie, las cuales son escasas y dispersas la matriz atribuidas al AC.

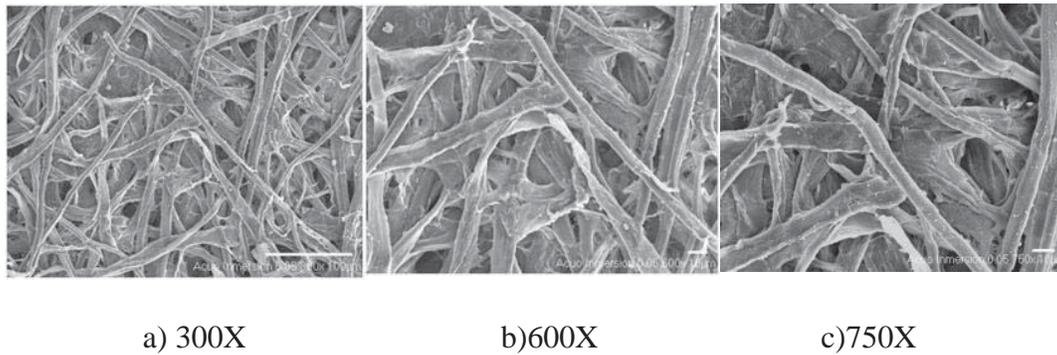


Fig. 4.54 Cel/acu/ACIm 0.05 wt%

0.5wt% de AC

Al incrementar la concentración del AC para el mismo sistema se puede confirmar que la presencia de las partículas atribuidas al AC se incrementa y se observa con mayor resolución la rugosidad en las fibras. Al comparar el proceso de inmersión en solución acuosa y solución ácida en la figura 4.55 se observa que la disolución acuosa permite la separación de las fibras conservándose su longitud aunque la rugosidad es mayor que en sistema ácido, y el AC adherido a la superficie está en menor proporción. Por lo cual se requirió un análisis químico puntual, para conocer la posible integración del AC en las fibras o corresponde únicamente a las partículas dispuestas en la superficie.

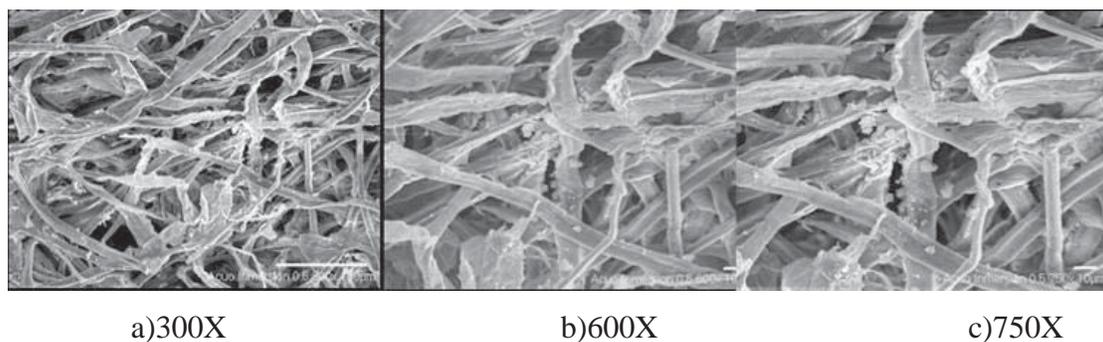


Fig.4.55 Cel/acu/ACIm 0.5 wt%

Integración *In situ***Disolución ácida****0.05wt% de AC**

En el sistema Cel/ac/ACIs con 0.05 wt% de ácido carmínico las micrografías obtenidas por SEM mostradas en la figura 4.56 a 100X, 300X y 750X muestran la formación de una nueva matriz continua en una sola fase. Por lo que el proceso de preparación de las películas promueve la ruptura y solubilidad de las fibras de celulosa. El ácido carmínico se solubiliza y se integra a la matriz.

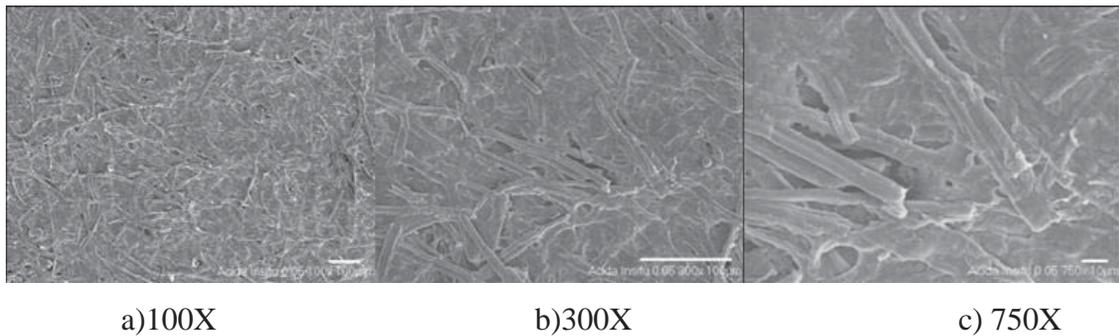


Fig. 4.56 Cel/ac/ACIs 0.05wt%

0.5wt% de AC

En el sistema Cel/ac/ACIs que se muestra en la figura 4.57, al aumentar la concentración de ácido carmínico a 0.5 wt%, se observan cambios importantes en la morfología de las películas, la presencia de fibras es irregular y escasa, el proceso *in situ* en solución ácida está directamente relacionado con los cambios estructurales en la matriz, se generan partículas esféricas recurrentes y se percibe una fase por lo cual se advierte la integración del AC nuevamente.

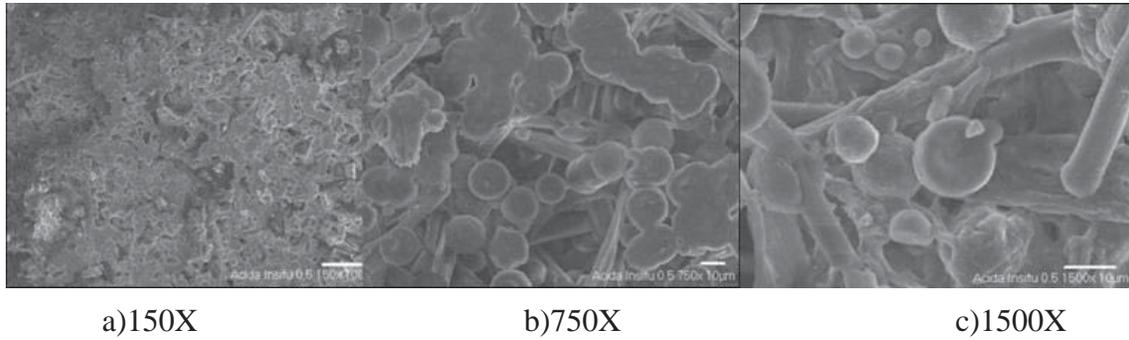


Fig. 4.57 Cel/ac/ACIs 0.5 wt%

Disolución acuosa

0.05wt% de AC

Las micrografías de la Figura 4.58 corresponden al sistema in situ en disolución acuosa, en donde se puede observar que las fibras conservan su estructura y son más lisas al comparar con el proceso de inmersión se puede advertir que in situ el AC se integra en mayor proporción y de forma homogénea a las fibras de celulosa.



Fig. 4.58 Cel/acu/ACIs 0.05 wt%

0.5wt% de AC

Las micrografías del sistema in situ en disolución acuosa con la mayor concentración de AC 0.5wt%, mostradas en la figura 4.59 indican que este proceso permite que la estructura original de las fibras se conserve y el AC se integre a las fibras posiblemente revistiendo su

superficie por lo cual se tornan mas lisas que en el sistema por inmersión en solución acuosa.

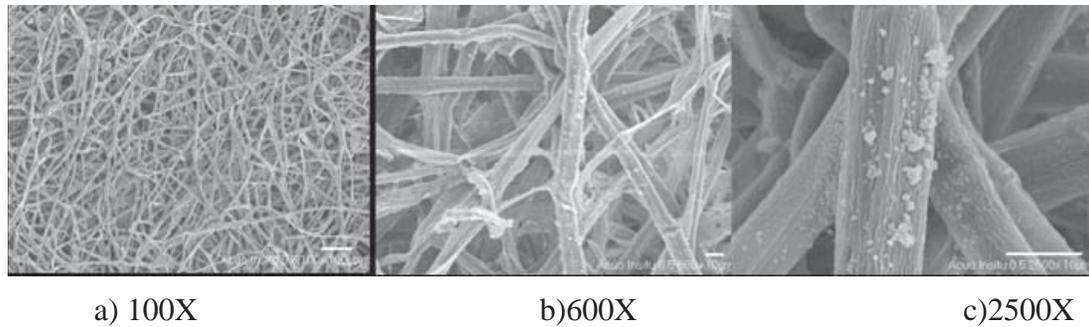


Fig. 4.59 Cel/acu/ACIs 0.5 wt%

Nanopartículas de celulosa

De acuerdo a los análisis obtenidos por SEM (Fig. 4.60) las nanopartículas de celulosa, presentan forma esférica, forman aglomerados y conservan su morfología inicial. A mayores magnitudes se observa el tamaño de las nanopartículas en orden nanométrico.

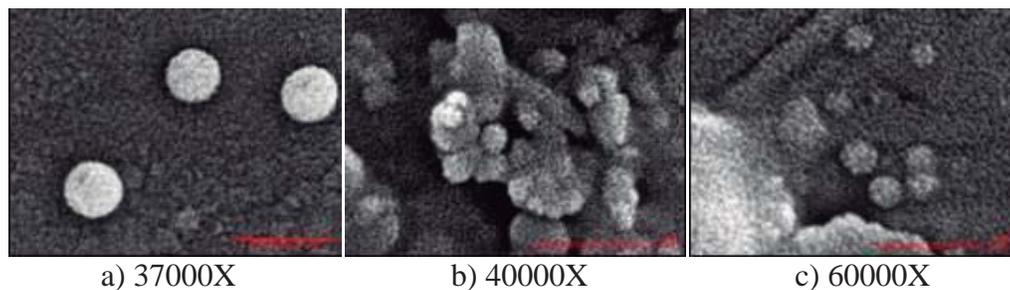


Fig. 4.60 Nanopartículas de celulosa

Nanopartículas + AC

Integración por Inmersión

Nanopartículas con AC al 0.05wt%

El análisis por SEM para el sistema Nano/ACIm con una concentración de 0.05wt% (Fig. 4.61) revela a 1000X una superficie con rugosidades con escasas partículas, a mayores aumentos (20000X y 40000X) se identifican algunas partículas con tamaños superiores a los 100nm, conservan su forma y se identifican menos aglomerados.



Fig. 4.61 Nano/ACIm 0.05 wt%

Nanopartículas con AC al 0.1wt%

Incrementando la concentración de AC a 0.1% los resultados (Fig. 4.62) a 5000X y 10000X muestran una fase, posiblemente de AC más densa y formación de aglomerados distribuidos al azar, con partículas de tamaños mayores a las encontradas a la concentración de 0.05%.

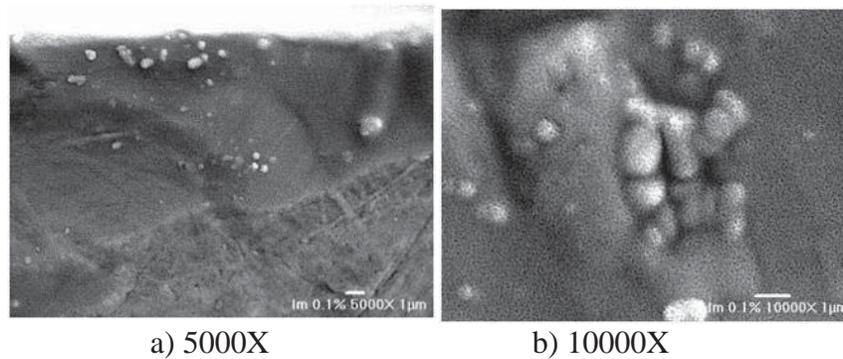


Fig. 4.62 Nano/ACIm 0.1 wt%

Nanopartículas con AC al 0.2wt%

En el análisis del mismo sistema a una concentración de 0.2% (Fig. 4.63) se observa a 100X la presencia de una capa de AC, se y se observan aglomerados de partículas de celulosa. La micrografía a 5000X muestra una aglomerado formado de partículas y AC cuyo tamaño final es mucho mayor comparado con las nanopartículas puras, así como las encontradas a concentraciones de AC menores. Se observa claramente que el AC reviste el aglomerado, pudiéndose pensar que el colorante favorece la aglutinación como se puede corroborar con la micrografía a 10000X donde se ven zonas de AC y celulosa muy densas.

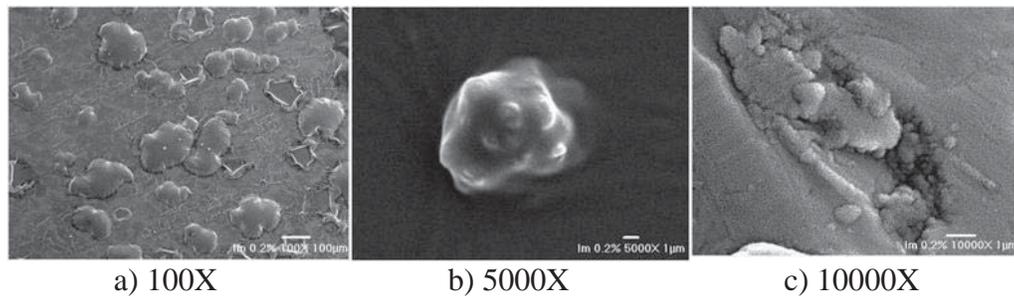


Fig. 4.63 Nano/ACIm 0.2 wt%

Nanopartículas con AC al 0.5wt%

Las micrografías obtenidas por SEM mostradas en la figura 4.64 para el mismo sistema Nano/ACIm a la concentración más alta (0.5wt%) corrobora que conforme se incrementa la concentración de colorante, favorece la aglomeración de las partículas de celulosa y se crean estructuras de tamaño mayores y la morfología esférica se modifica notablemente.

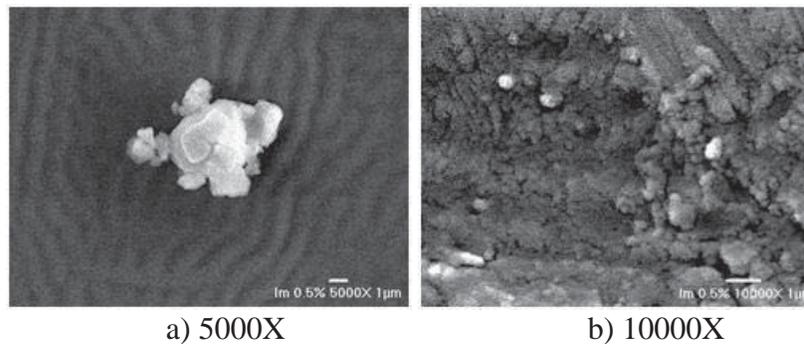


Fig. 4.64 Nano/ACIm 0.5 wt%

Integración *In situ*

Nanopartículas con AC al 0.05wt%

Los resultados por SEM para el sistema Nano/ACIs a una concentración de 0.05% se muestran en la figura 4.65, denotando una fase distribuida con mayor homogeneidad comparado con el proceso de integración por inmersión, atribuyéndose al AC. Existen partículas de celulosa así como aglomerados formados por las mismas.

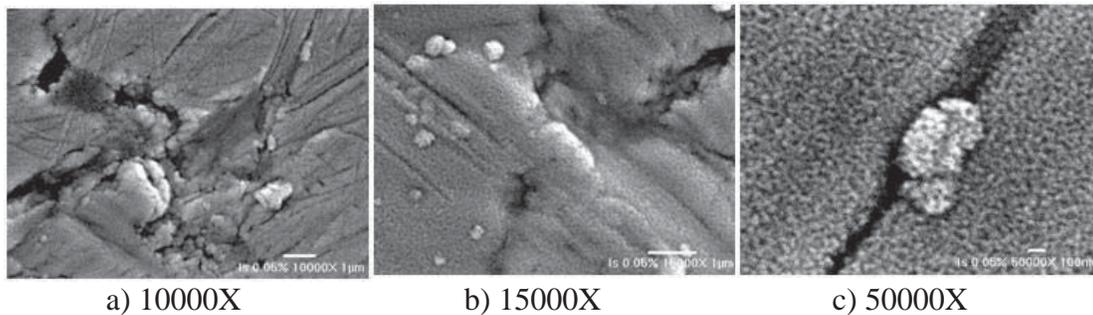


Fig. 4.65 Nano/ACIs 0.05 wt%

Nanopartículas con AC al 0.1wt%

El sistema Nano/ACIs manejado a una concentración de 0.1wt% (Fig. 4.66), denota áreas donde se forma una sola fase, sin embargo, se logra observar la presencia de aglomerados, así como partículas aisladas y con tamaños que si bien son mayores a los 100 nm no son tan grandes como las obtenidas en el proceso de integración de AC por inmersión.

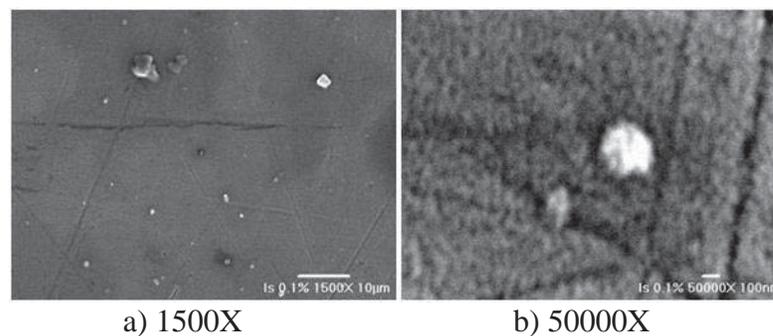


Fig. 4.66 Nano/ACIs 0.1 wt%

Nanopartículas con AC al 0.2wt%

En el análisis del mismo sistema a una concentración de AC de 0.2wt% mostrado en la figura 4.67 se observa a 500X una fase formada por el AC, distribuido con una menor formación de aglomerados. Se encontraron a 10000X y 60000X algunas partículas aisladas y con la forma esférica similar a las nanopartículas solas, y de tamaño inferior a aquellas obtenidas por el proceso de inmersión.

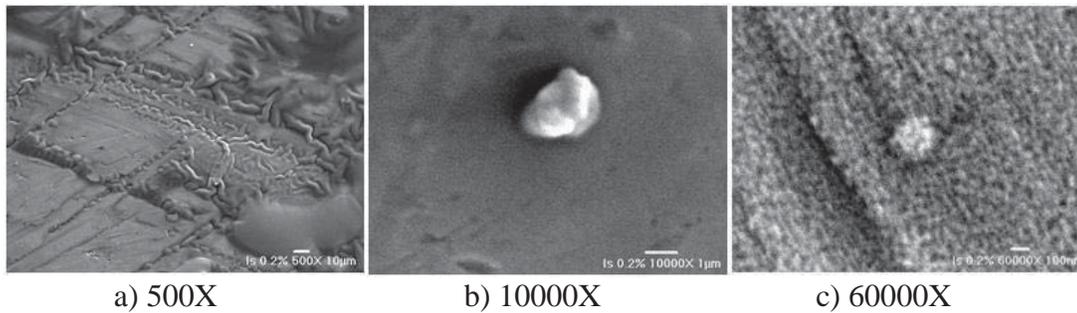


Fig. 4.67 Nano/ACIs 0.2 wt%

Nanopartículas con AC al 0.5wt%

Incrementando la concentración de AC a 0.5%, por medio del análisis por SEM (Fig. 4.68) se visualiza la formación de una capa más densa y homogénea, atribuida al AC, además se incrementa la formación de aglomerados respecto a las concentraciones menores manejadas; sin embargo, comparado con los resultados de la integración por inmersión en este sistema las partículas son de menor tamaño y conservan una forma más definida.

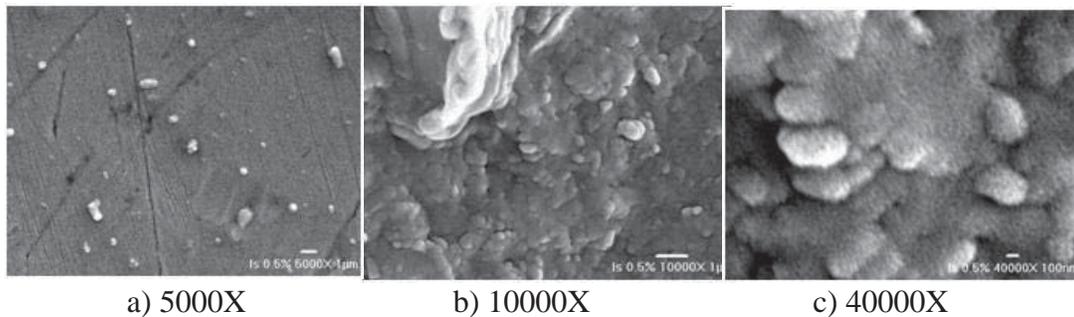


Fig. 4.68 Nano/ACIs 0.5 wt%

4.4.5 Espectroscopía Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

A continuación se presentan los resultados obtenidos para las películas obtenidas por disolución ácida y acuosa y la integración del AC a éstas, cabe mencionar que se presentan también los espectros de FTIR para el AC, así como para las películas en su estado puro.

a) FTIR del Ácido Carmínico (AC)

La Figura 4.69 muestra el FTIR correspondiente al AC. A 3333 cm^{-1} se observa la señal característica del grupo OH. Esta banda se debe a la vibración por estiramiento, por la presencia de fuertes enlaces intermoleculares unidos al grupo carbonilo (C=O) en la molécula del AC. Así también, se observan las frecuencias características de la vibración por estiramiento de los grupos hidrocarbonados, localizándose la vibración asimétrica del CH_3 a 2925 cm^{-1} , fácilmente distinguida por la cercanía del CH_2 a un número de onda de 2844 cm^{-1} .

El grupo C=O presenta un pico a 1635 cm^{-1} . A 1564 cm^{-1} , se observa una banda fuerte por las vibraciones por estiramiento del anillo aromático carbono-carbono (C=C). A 1468 cm^{-1} está la banda de vibración, por la deformación asimétrica del grupo CH_3 . Así también, se observa la deformación del grupo OH a 1289 cm^{-1} y la vibración por estiramiento del enlace C-OH a 1081 cm^{-1} . En la tabla 4.11 se indican las frecuencias características (teóricas) del AC.

Tabla 4.11 Bandas de absorción por FTIR características para el AC.

Frecuencia (cm^{-1})	Grupo funcional
3350 – 3230	Tensión –OH
2950±25	Vibración asimétrica CH_3

2870 – 2840	Tensión simétrica CH ₂
1690±50	Tensión C=O
1590 – 1565	Vibración estiramiento C=C
1480 – 1440	Deformación asimétrica CH ₃
1440 – 1260	Deformación –OH
1085 – 1030	Estiramiento C-OH

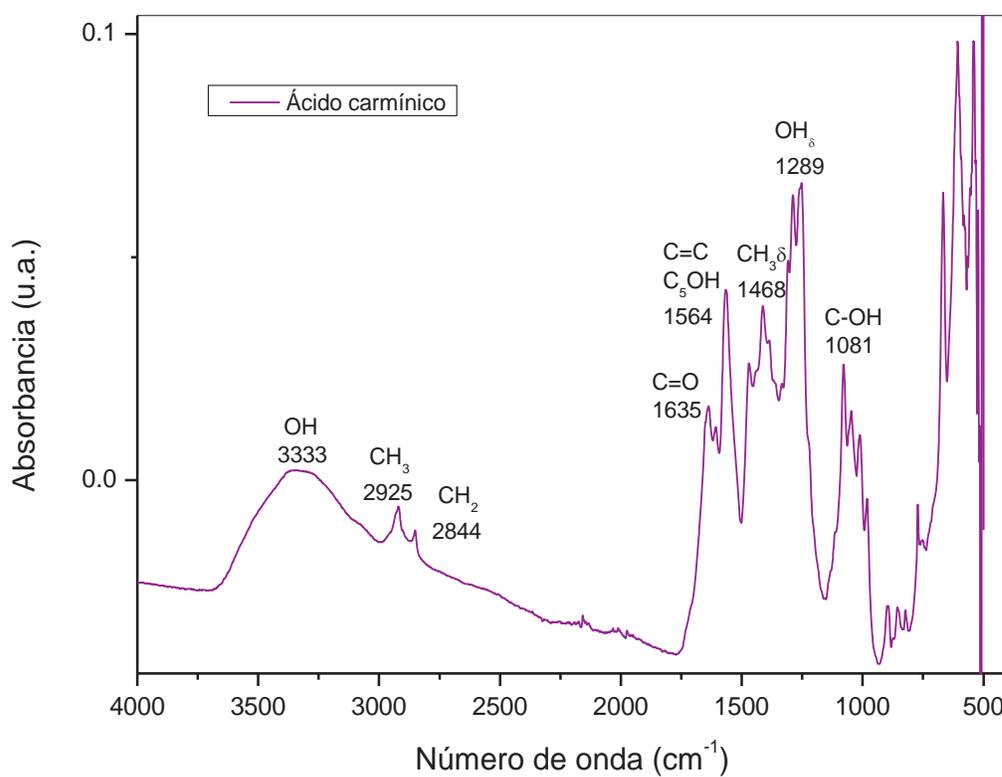


Fig.4.69 Espectro FTIR del Ácido Carmínico

Películas de celulosa

b) FTIR de la película obtenida por disolución ácida

En la figura 4.70 se muestra el resultado de FTIR para la película de celulosa por disolución ácida. Se observa a 3347cm^{-1} que se encuentra la banda con vibración de tensión simétrica (vs) característico del $-\text{OH}$, con una alta intensidad y bajas frecuencias debido a los enlaces intermoleculares.

La vibración de tensión asimétrica correspondiente al CH_3 se manifiesta a 2901 cm^{-1} . No se observa la vibración de tensión simétrica del C-H en esta área. La vibración de deformación asimétrica se localiza en 1432 cm^{-1} , y la deformación simétrica del CH_2 a 1319 cm^{-1} . En 1711 cm^{-1} se observa un hombro que se atribuye a un C=O después de una oxidación. El pico a 1642 cm^{-1} , se asocia a moléculas de agua, en 1156 cm^{-1} se observa la tensión asimétrica del puente C-O-C y finalmente la vibración a 1031 cm^{-1} se asocia al estiramiento del enlace C-OH.

c) FTIR de la película obtenida por disolución acuosa

En la figura 4.71 se muestra el resultado de FTIR para la película de celulosa por disolución acuosa. Se observa a 3394 cm^{-1} que se encuentra la banda con vibración de tensión simétrica (vs) característico del $-\text{OH}$, con una alta intensidad y más ancha que la obtenida en disolución ácida con sobretonos entre 3266 y 3489 cm^{-1}

La vibración de tensión asimétrica correspondiente al CH_3 , se manifiesta a 2947 cm^{-1} . Además se observa la vibración de tensión simétrica del C-H en 2900 cm^{-1} . La vibración de deformación asimétrica se localiza en 1432 cm^{-1} con muy baja intensidad comparada con la disolución ácida y la deformación simétrica del CH_2 a 1324cm^{-1} . El pico a 1644 cm^{-1} , asociada a moléculas de agua, se incrementa notablemente y en 1160 cm^{-1} se observa la

tensión asimétrica del puente C-O-C. La vibración a 1059 cm^{-1} se asocia al estiramiento del enlace C-OH. En general las señales son menos definidas que las observadas en las películas en disolución ácida.

La tabla 4.12 muestra las frecuencias características de la celulosa.

Tabla 4.12 Bandas de absorción por FTIR características para la celulosa.

Frecuencia (cm^{-1})	Grupo funcional
3348 – 3175	Tensión –OH
2970 – 2945	Tensión CH
2900 – 2874	
2933 (Celulosa II)	Tensión asimétrica CH_2
2853 (Celulosa I y II)	
1635	-OH del agua absorbida por la celulosa
1455, 1335	Flexión en el plano –OH
1420	Deformación CH_2
1375, 1278	Flexión CH
1315	Aleteo CH_2
1155	Tensión asimétrica del puente C-O-C
1111	Tensión asimétrica del anillo
1055 – 1035	Tensión C-O

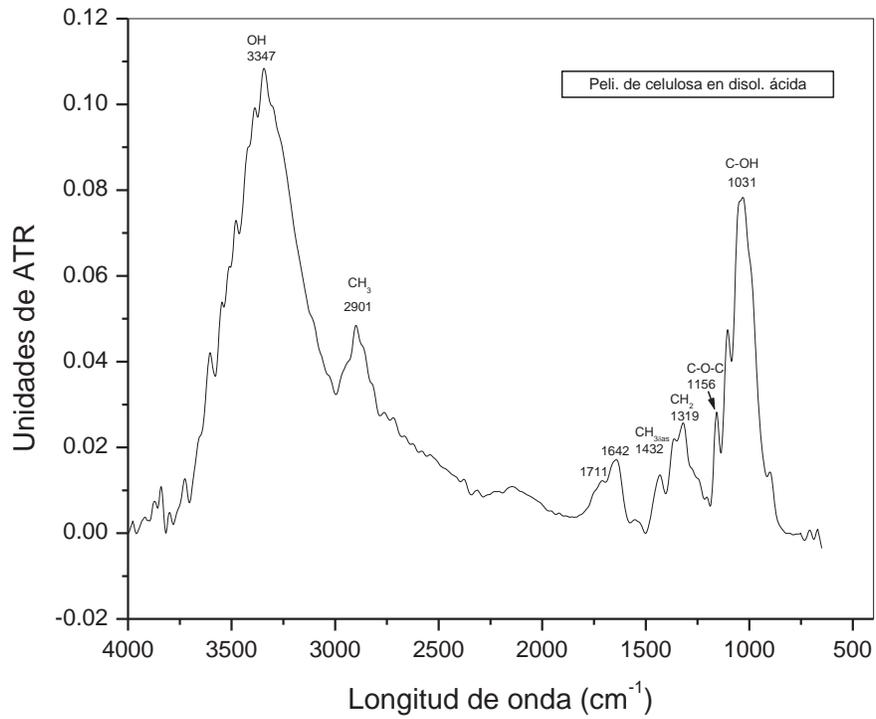


Fig.4.70 Espectro FTIR de Cel/ac

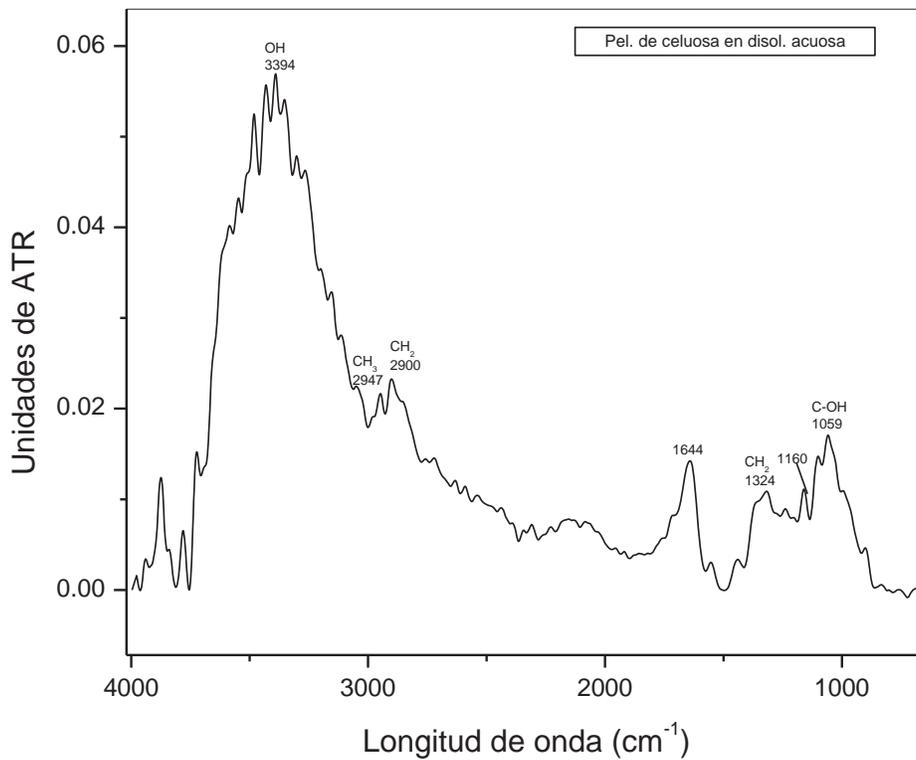


Fig. 4.71 Espectro FTIR de Cel/acu

Películas + Acido carmínico

Integración por inmersión

Disolución ácida

Espectro de FTIR una vez integrado el AC a la película de celulosa, con 0.05% wt de AC.

En el análisis por FTIR de la película en disolución ácida con AC por inmersión a una concentración de 0.05 wt%, se puede apreciar señales tanto de la celulosa como del AC (Fig. 4.72).

La señal del OH no se presenta como una señal característica del grupo funcional, posiblemente por la baja concentración del AC. Sin embargo si se observa la vibración de estiramiento del mismo grupo en 1029 cm^{-1} , se observa un ligero desplazamiento de la banda hacia la derecha.

Las vibraciones típicas de los CH_3 y CH_2 , no se registran con claridad, la vibración en 1701 cm^{-1} se asocia al grupo C=O de los grupos aromáticos presente en el AC, con un desplazamiento a frecuencias mayores por la presencia de átomos electronegativos o grupos adyacentes. En 1648 cm^{-1} se indica la vibración de posibles moléculas de agua en celulosa con menor intensidad, las vibraciones del C=C y del C₅OH se observan en 1519 cm^{-1} como en el AC puro. Las vibraciones de deformación del CH_3 desaparecen, conservándose la señal de la tensión asimétrica del C-O-C.

Disolución acuosa

Espectro de FTIR una vez integrado el AC a la película de celulosa, con 0.5% wt de AC.

Para el sistema Cel/acu/ACIm al 0.5wt%. La Figura 4.73 no muestra la frecuencia correspondiente al grupo OH aun cuando se presenta el espectro con la concentración más alta de AC. Las bandas asociadas al grupo metilo y metileno no se presentan, esto puede

atribuirse a una baja interacción (Fuerzas de Van der Waals) entre ambos compuestos. La vibración del grupo C=O aromático se ve desplazada hacia frecuencias mayores a 1694 cm^{-1} por la presencia de grupos adyacentes, mismo fenómeno se observó en el sistema ácido (Fig. 4.72). La banda atribuida a moléculas de agua se reduce su intensidad comparada con la película sin AC. En la región de 1565 cm^{-1} se encuentra la banda que indica las vibraciones del C=C y del C₅OH, mientras que en la frecuencia en 1059 cm^{-1} se aprecia la vibración de estiramiento del enlace C-OH, ubicada en la misma región que la película de celulosa y con un ligero desplazamiento con respecto al AC.

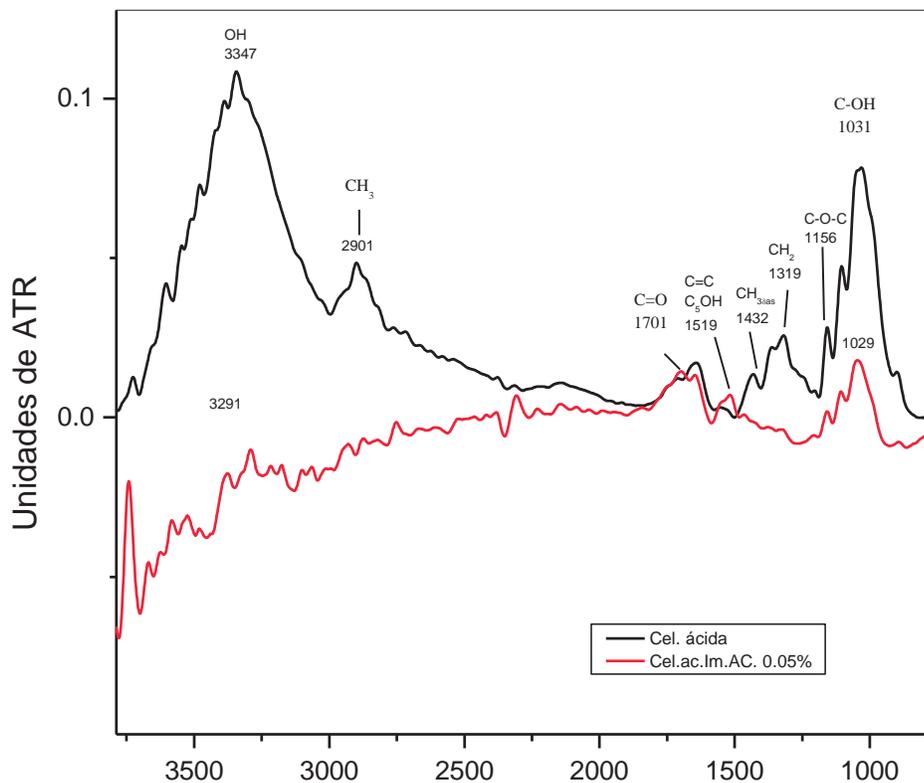


Fig.4.72 FTIR de : a) Cel/ac , b)Cel/ac/ACIm 0.05wt%

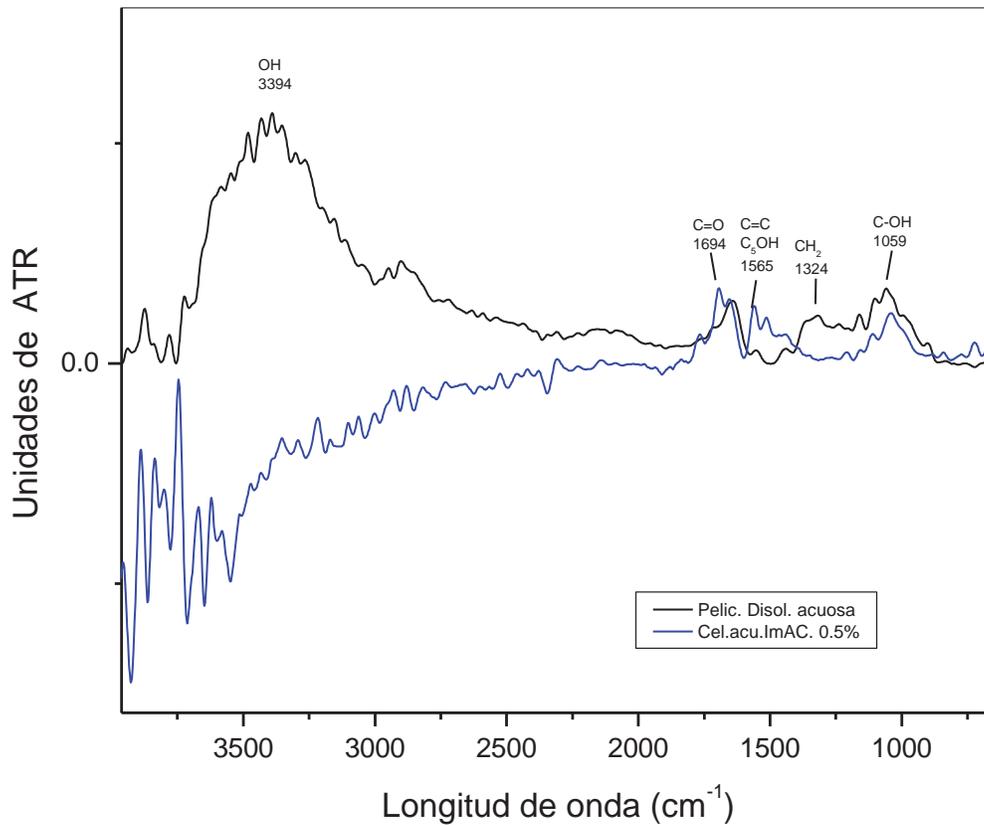


Fig. 4.73 FTIR de : a) Cel/acu, b) Cel/acu/ACIm 0.5wt%

Integración *In situ*

Disolución ácida

Espectro de FTIR una vez integrado el AC a la película de celulosa, con la concentración de 0.05% wt de AC.

En la figura 4.74 se presentan los espectros del AC, la película de celulosa por disolución ácida y la película con AC *in situ* al 0.05wt%. En el espectro de la película con AC se observan con mayor definición las señales, lo que posiblemente se debe al proceso de incorporación del AC.

La vibración de estiramiento del grupo OH si se identifica en 3297 cm^{-1} y se determina la existencia de desplazamiento de la banda del grupo OH, el desplazamiento es hacia la derecha con respecto a la película sin AC, lo que sugiere la presencia de enlaces intermoleculares por puentes de hidrogeno bien por tensión angular por atracciones de Van der Waals.

Para este sistema si se identifican las vibraciones de de tensión asimétrica y simétrica correspondiente al CH_3 en las frecuencias a 2928 y 2879 cm^{-1} respectivamente. El grupo $\text{C}=\text{O}$ se manifiesta en 1698 en modo de vibración de estiramiento con mayor intensidad que el sistema por inmersión. Las vibraciones del $\text{C}=\text{C}$ y del C_5OH se observan en 1519 cm^{-1} como en el AC puro. Las vibraciones de deformación del CH_3 se indican en 1432 cm^{-1} , y finalmente la señal de la tensión asimétrica del $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ se observa con una menor intensidad en 1156 cm^{-1} lo cual posiblemente se debe a ruptura parcial de estos enlaces. Los resultados al vincularse con las micrografías por SEM, sugieren una clara integración del AC en las películas de celulosa con presencia de interacciones químicas.

Disolución acuosa.

Espectro de FTIR una vez integrado el AC a la película de celulosa, presentando la concentración de 0.5%.

En la Figura 4.75 se compara los espectros de la película de celulosa por dilución acuosa, el AC y las películas con AC integrado *In situ* al 0.5wt%.

Al igual que el sistema por dilución acuosa e inmersión, las bandas de los grupos OH, CH_3 y CH_2 no se presentan. Es notoria la menor intensidad que presenta la vibración correspondiente al grupo $\text{C}=\text{O}$ aromático. Así también el grupo $\text{C}=\text{C}$ prevalece y se registra en 1526 cm^{-1} , característico del AC.

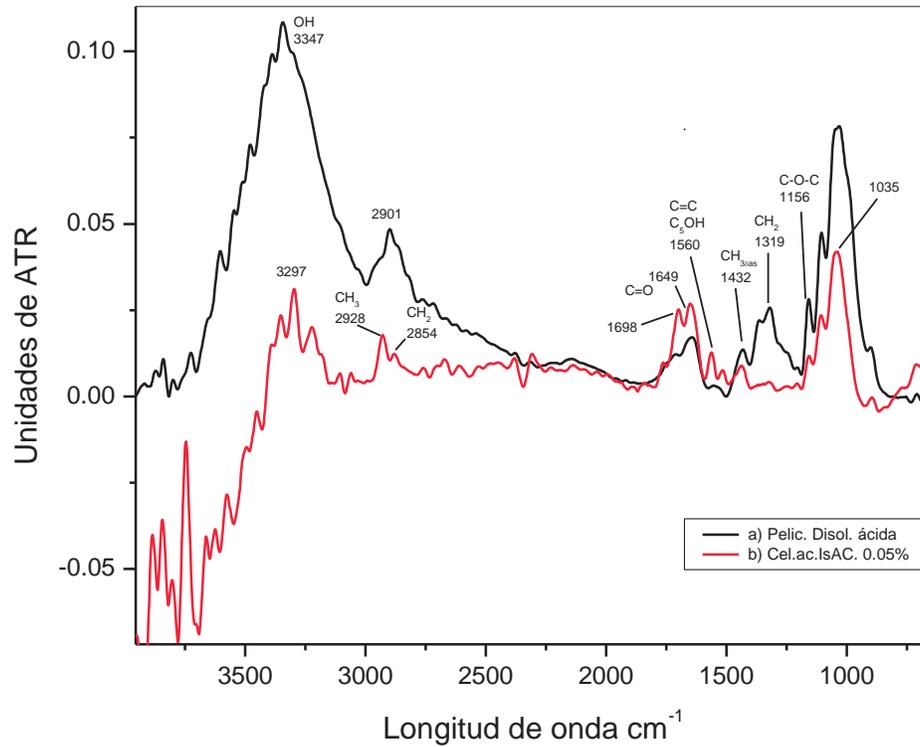


Fig.4.74 FTIR de: a) Cel/ac , b)Cel/ac/ACIs 0.05wt%

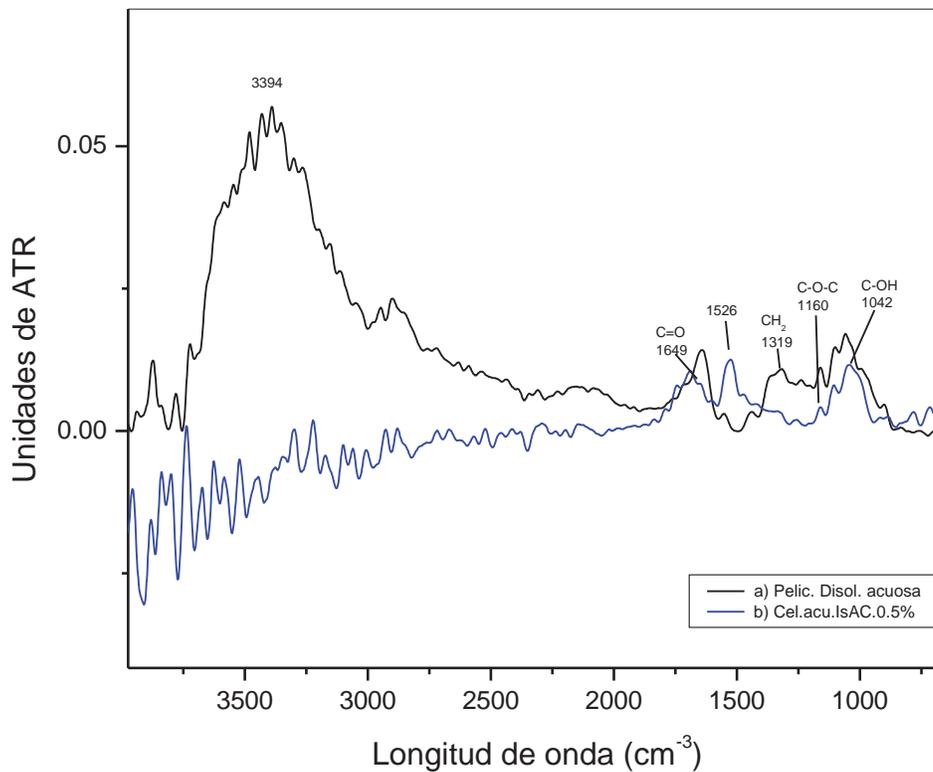


Fig. 4.75 FTIR de : a) Cel/acu, b)Cel/acu/ACIs 0.5wt%

Nanopartículas de celulosa

Nanopartículas puras

En la figura 4.76 se muestra el resultado de FTIR para las nanopartículas de celulosa de eucalipto. Se observa a 3335cm^{-1} la banda correspondiente a la vibración de tensión simétrica característico del $-\text{OH}$. En cuanto a la vibración de tensión correspondiente al estiramiento del grupo CH y CH_2 , se manifiesta a 2917 cm^{-1} y 2853 cm^{-1} respectivamente. De $1436 - 1313\text{ cm}^{-1}$ se localizan las bandas con vibración de deformación de los mismos grupos. En 1163 cm^{-1} se aprecia la banda de tensión asimétrica correspondiente al puente C-O-C característico de las unidades de glucosa. A 1105 cm^{-1} se hace evidente la banda correspondiente a la tensión asimétrica del anillo de glucosa. Y por último se manifiesta en 1054 cm^{-1} y 1028 cm^{-1} la vibración de tensión simétrica de los enlaces C-O .

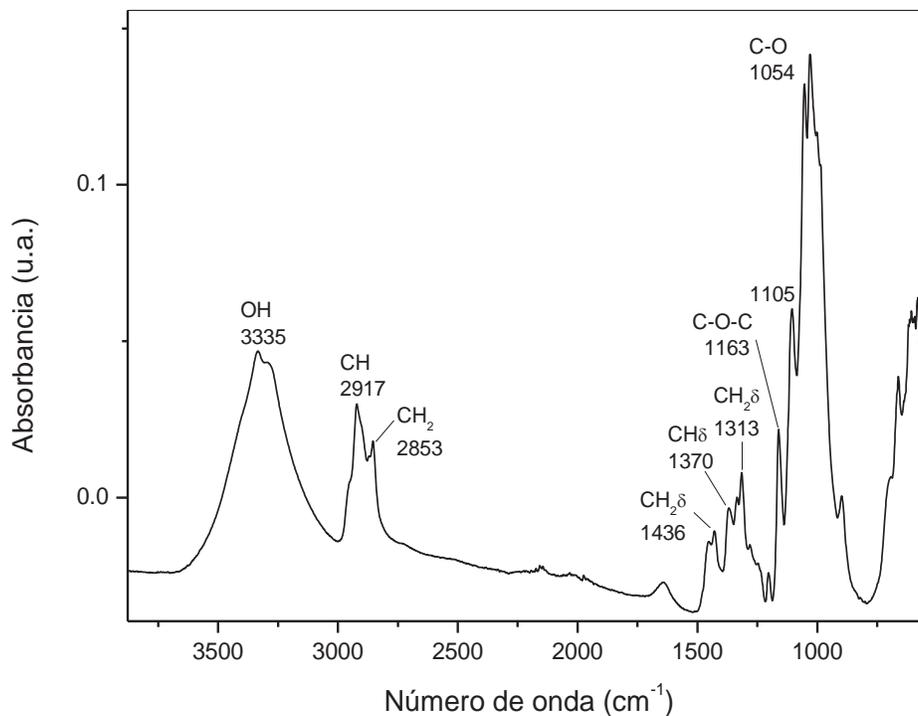


Fig. 4.76 Espectro FTIR para las nanopartículas de celulosa

Nanopartículas + Ácido Carmínico

Enseguida se muestran los espectros FTIR obtenidos una vez integrado el AC a las nanopartículas de celulosa con cuatro diferentes concentraciones de AC obtenidas por los métodos de inmersión e *In situ*.

Integración por Inmersión

En la Figura 4.77 se muestran los espectros de absorción correspondientes a las nanopartículas con AC obtenidas por inmersión a diferentes concentraciones. La banda de vibración de los grupos OH se observa a la misma longitud de onda comparada con los compuestos puros (3335 cm^{-1}), la señal asociada a este grupo es muy similar en las cuatro concentraciones, indicando que la estructura molecular de los OH's se conserva. Todos los compuestos presentan bandas anchas con diferentes intensidades. A concentraciones bajas (0.1 y 0.2 wt%) la intensidad de las señales es la misma, lo que se asocia a la capacidad de disociación de los grupos OH por lo que se manifiestan en mayor proporción. La menor intensidad de absorción de la señal del OH es con 0.05wt%, este comportamiento se explica ya que al igual que las concentraciones anteriores existe una disociación de interacciones intramoleculares asociada con la concentración de AC.

Con 0.5wt% de AC, la vibración del OH presenta intensidades menores, por lo que se deduce que existen mayores interacciones intramoleculares por lo que a pesar del incremento del AC y por consecuencia de los grupos OH, no se advierte su presencia en altas concentraciones.

En la figura 4.78 se realiza un acercamiento en la zona de 1800 a 550 cm^{-1} para observar más claramente las diferencias entre los espectros de las nanopartículas con AC. Se puede observar que la banda correspondiente al grupo carbonilo C=O (1640 cm^{-1}) se expresa con mayor intensidad al incrementarse la concentración de AC. Por lo que se puede elucidar que a menores concentraciones el grupo C=O se revela en menor proporción, esto es debido a la estabilidad del grupo C=O y la resonancia en los grupos aromáticos de AC.

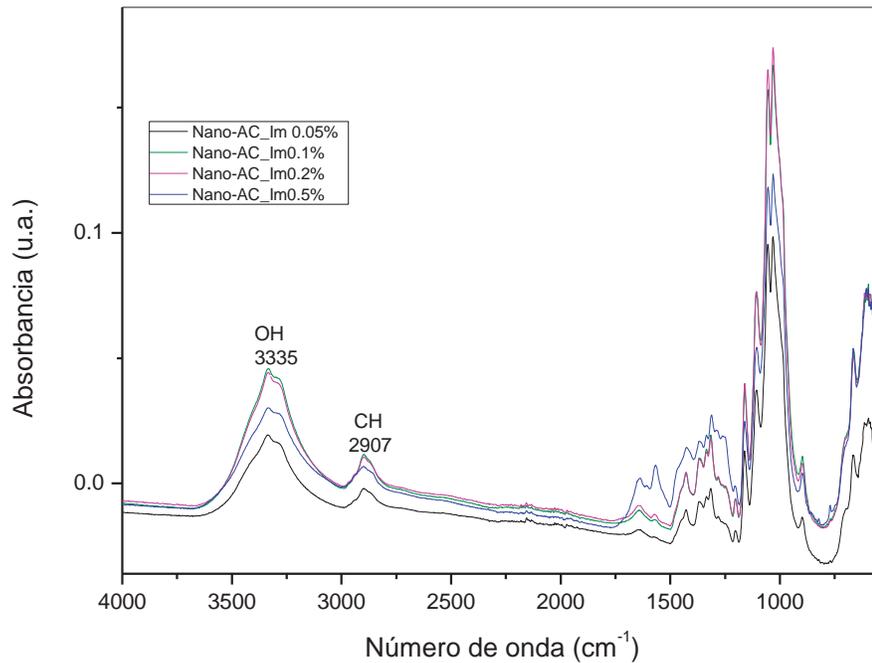


Fig. 4.77 Espectro FTIR para Nano/ACIm con las cuatro concentraciones de AC

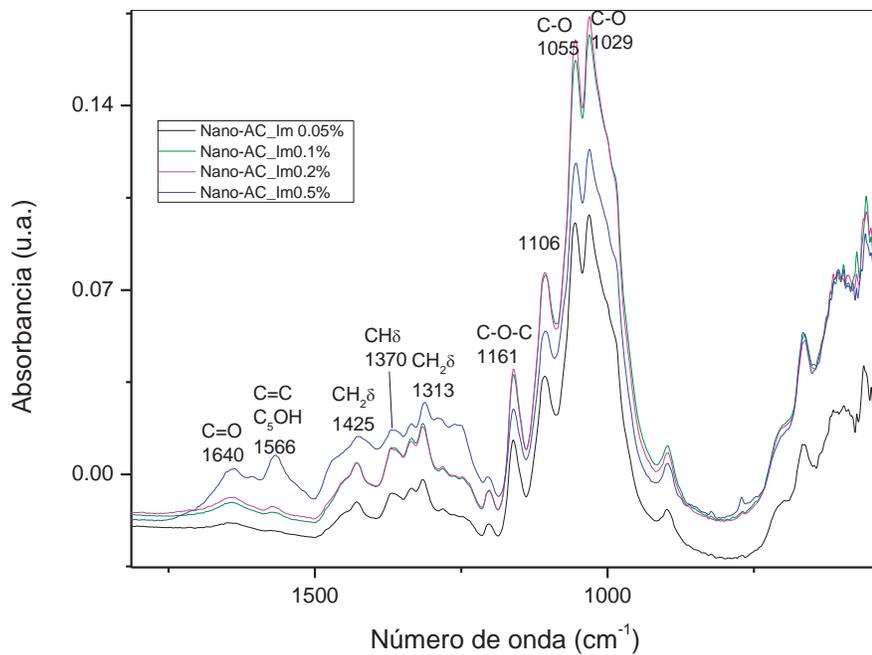


Fig. 4.78 Acercamiento del espectro FTIR para Nano/ACIm con cuatro diferentes concentraciones de AC.

Integración *In situ*

En la Figura 4.79 se presenta el espectro de absorción para las nanopartículas con AC obtenidas por el proceso *in situ*.

A diferencia del método por inmersión se observa que la señal en 3337cm^{-1} que corresponde a la vibración de tensión de los OH's, la intensidad se incrementa proporcionalmente a la concentración de AC, en específico para la mayor concentración de 0.5 wt%, lo cual puede deberse a que durante el proceso *in situ* el AC se disocia previamente facilitando su integración dentro de la celulosa posiblemente por un proceso de absorción, ya que como lo demuestra el análisis por SEM la celulosa presenta porosidad.

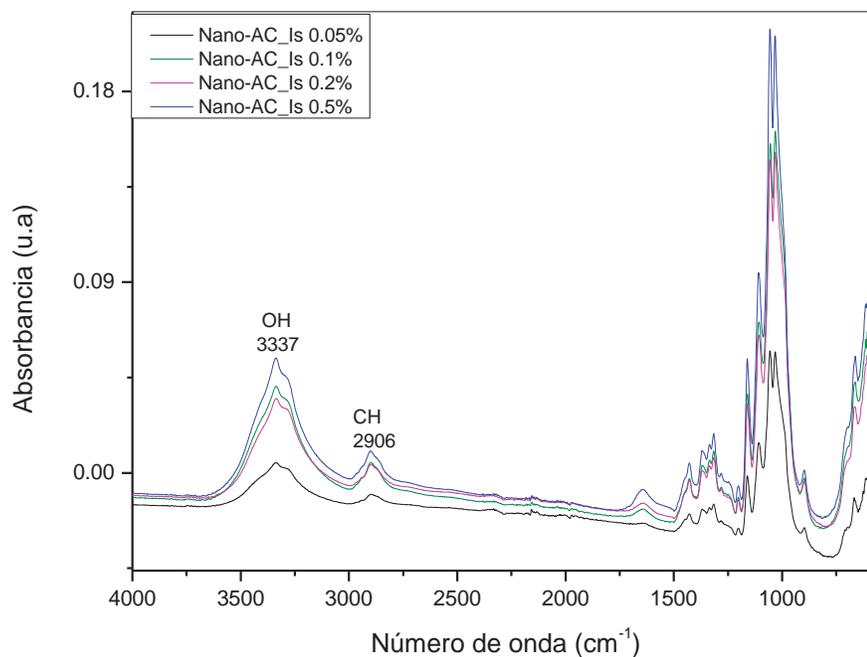


Fig. 4.79 Espectro FTIR para las nanopartículas + AC *In situ* a las diferentes concentraciones

Para analizar con mayor detalle el método *in situ*, se realiza un acercamiento a la zona 1800-550 cm^{-1} (Figura 4.80). Se puede observar el mismo comportamiento del grupo carbonilo que en el proceso de inmersión. A mayores concentraciones de AC habrá mayor intensidad del grupo $\text{C}=\text{O}$.

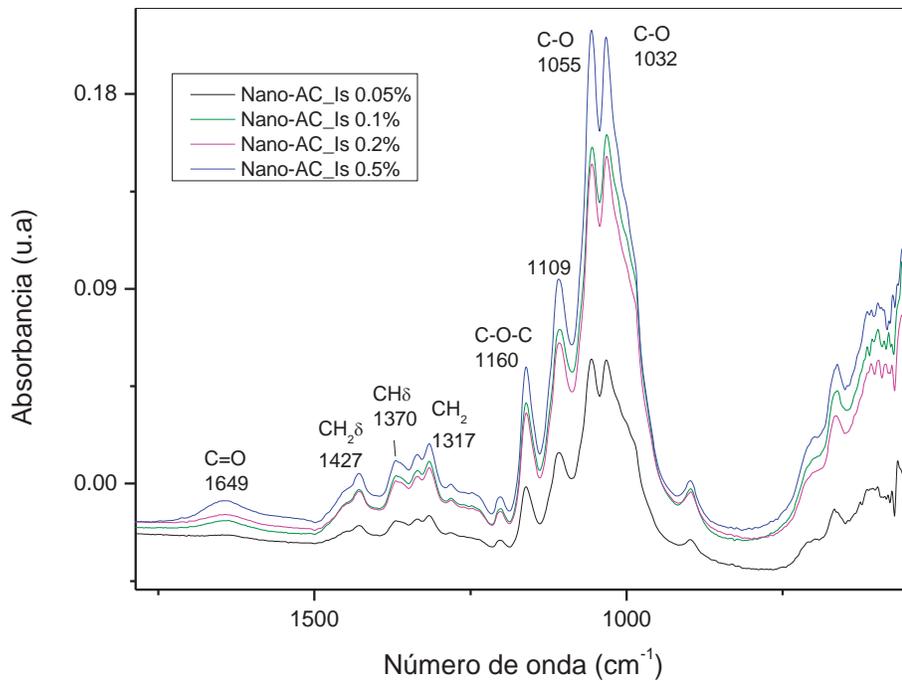


Fig. 4.80 Acercamiento del espectro FTIR para las nanopartículas + AC *In situ* a las diferentes concentraciones

4.4.6 Evaluación del sistema AC-Cel ante condiciones variables de humedad y temperatura.

El sistema AC-Cel se midió por UV-Vis y luminosidad.

Una vez expuestas las matrices durante 7 días a diferentes condiciones de humedad y temperatura, los resultados obtenidos de luminosidad, son los que se muestran en la tabla 4.13

Tabla 4. 13 Luminosidad de las matrices de celulosa Cel/ac/ACIs 0.5wt%, Cel/acu/ACIs 0.5wt% y Nano/ACIs 0.5wt%, sometidas a diferentes condiciones de humedad y temperatura.

LUMINOSIDAD (L)				
MATRIZ	CONDICIONES			
	SIN TRATAMIENTO	25°C-65%HR	37°C-65%HR	37°C-75%HR
Cel/ac/ACIs 0.5wt%	16.85	15.2	14.5	13.9
Cel/acu/ACIs 0.5wt%	47.11	43.1	43.8	37.5
Nano/ACIs 0.5wt%	44.75	35.3	33.7	30.68

En el análisis de luminosidad para los sistemas expuestos a diferentes condiciones de humedad y temperatura, se observa para las tres matrices una disminución proporcional de luminosidad al incremento de humedad y temperatura, indicando que la matriz es más opaca, pudiéndose atribuir a una disgregación y disolución del AC promovida por la temperatura y humedad. Para corroborar estos resultados e identificar si el AC es el causal de este comportamiento, se realizaron pruebas de UV-VIS

Por UV-Vis de acuerdo a los trabajos reportados por Beatriz 2005, el AC, presenta picos de máxima absorción en la región VIS $\lambda = 494$ nm característica, adicionalmente $\lambda = 215$ nm y $\lambda = 315$ nm.

Analizando los resultados obtenidos en este trabajo, en los espectros de absorción de la Figura 4.81, se muestra el sistema de nanopartículas con AC obtenidas *In situ* (Nano/ACIs) sin tratamiento adicional, Nano/ACIs expuestas a 25°C con 65% humedad, y Nano/ACIs expuestas a 37°C con 75% de humedad.

Analizando las absorciones del AC puro y el sistema Nano/AC, se advierte la interacción del AC con la celulosa por el desplazamiento de las bandas de absorción correspondientes al colorante, así un desplazamiento hacia la región del Infrarrojo es observado. Longitudes de onda de menor energía son capaces de interactuar con el colorante, lo cual corrobora los resultados de FTIR.

Por otro lado para este mismo sistema, considerando que no existe una diferencia de concentración del AC en la matriz de celulosa. Se puede establecer que el incremento de la señal de absorción se debe a la exposición del colorante (AC), esta situación es posible debido a una mejor disgregación del AC sobre la matriz (nanopartícula) de celulosa. Esta disgregación se vio favorecida por una relajación molecular generando un mayor volumen en la molécula de las cadenas de celulosa.

Así se puede concluir que las moléculas de AC ocupan posiciones más distantes unas de otras sobre la matriz de la celulosa. Esta condición fue favorecida por la temperatura y humedad.

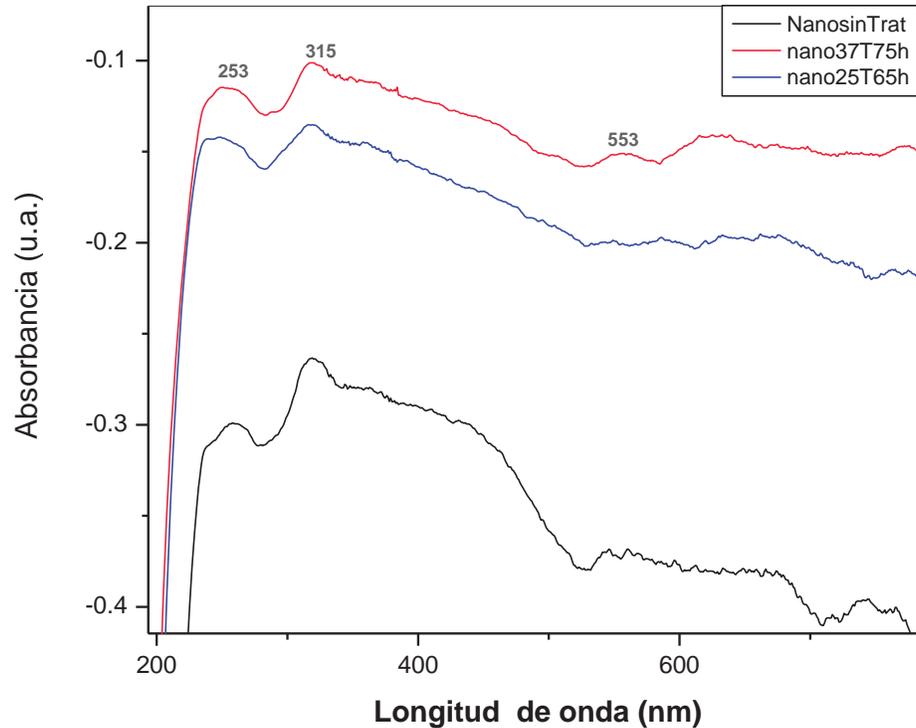


Fig. 4.81 Espectro UV-Vis de Nano/ACIs con tratamientos de temperatura y humedad

4.5 Simulación molecular de Celulosa y AC

Se utilizó el software Accelrys Materials Studio 5.0 para representar los modelos de AC y cadenas poliméricas de celulosa. Se analizaron modelos de 1 a 200 unidades monoméricas de celulosa y las interacciones moleculares que se generan en el sistema AC-Celulosa. Las estructuras más estables se consideraron en la optimización de la geometría espacial a la mínima energía.

Simulación molecular de la celulosa

En la figura 4.82 se muestra la cadena de celulosa de 10 monómeros optimizada mediante un software comercial llamado Materials Studio desarrollado por Accelrys Inc. Esta cadena presenta una ligera rotación debido a los enlaces glicosídicos β 1-4. Los cuales tienen

ángulos de torsión en valores aproximados de -110° para el enlace $\beta 1$ y -155 para el enlace $\beta 4$.

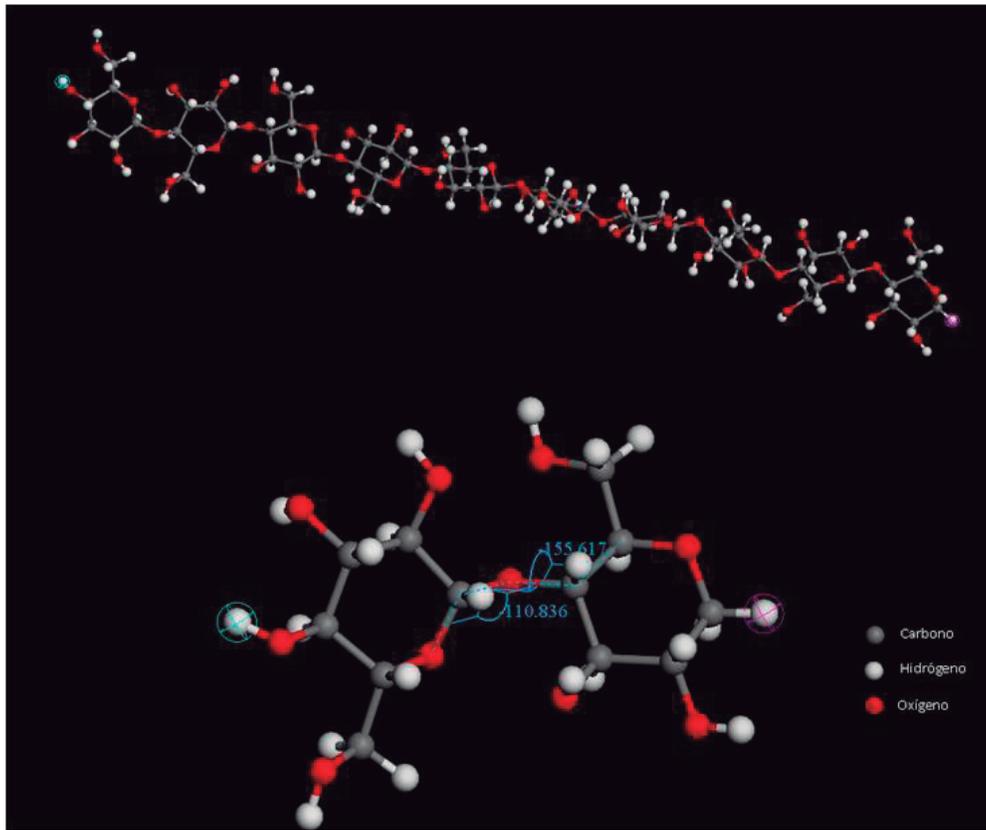


Fig.4.82 Cadena de celulosa con 10 monómeros, acercamiento al enlace glicosídico.

A partir de la cadena anterior de un arreglo con 10 monómeros se construyó una cadena de celulosa de mayor longitud; esta fue de 50 unidades (Figura 4.83a) y a partir de esta molécula se construyó otra cadena de 200 unidades monoméricas (Figura 4.83b). En cada caso la optimización fue convergente.



Fig. 4.83 Cadena de celulosa con A) 50 y B) 200 monómeros.

De acuerdo a la simulación molecular, no se presentan cambios en la conformación molecular de la estructura cuando el número de monómeros se incrementa de 10 a 200 unidades. Así, se puede estimar que la existencia de una “linealidad” molecular a un valor aproximado a las 200 unidades monoméricas.

La característica de “linealidad” molecular conlleva la posibilidad empaquetamientos por el acoplamiento de esta molécula con otras de igual naturaleza química. Así en la Figura 4.84 se indica el arreglo de cinco cadenas de celulosa cada una de ellas constituida por de 200 unidades. Como resultado de este acoplamiento se observa la generación de sitios de interacción regularmente distribuidos a los largo de las cadenas.

La molécula de celulosa construida de 200 unidades monoméricas, presenta 5 sitios de interacción, un sitio cada 40 unidades monoméricas. Esta proporción de sitios es un indicativo de la cristalinidad que se presenta en este tipo de moléculas. Adicionalmente, se observa que las moléculas eligen una conformación relativamente plana con centros de unión a través de puentes de hidrógeno.

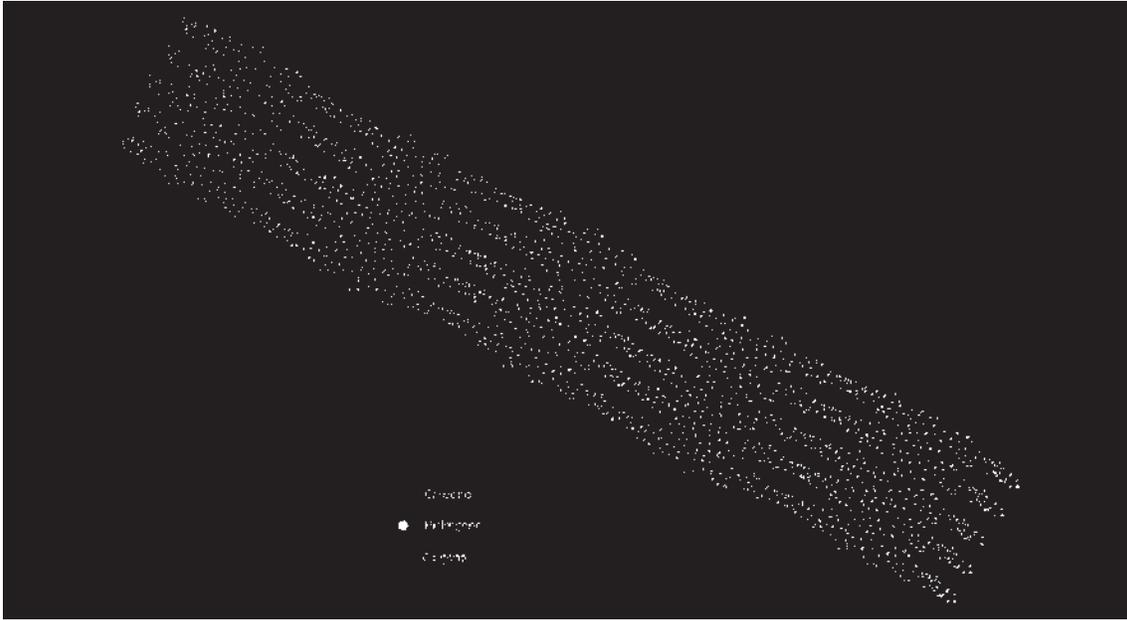


Fig.4.84 Cinco cadenas de celulosa de 200 unidades.

Para observar con más detalle los centros de unión responsables de las interacciones intermedias en las moléculas de celulosa. En la figura 4.85 se realiza un acercamiento a los sitios de interacción que se presentan en la figura 4.84.

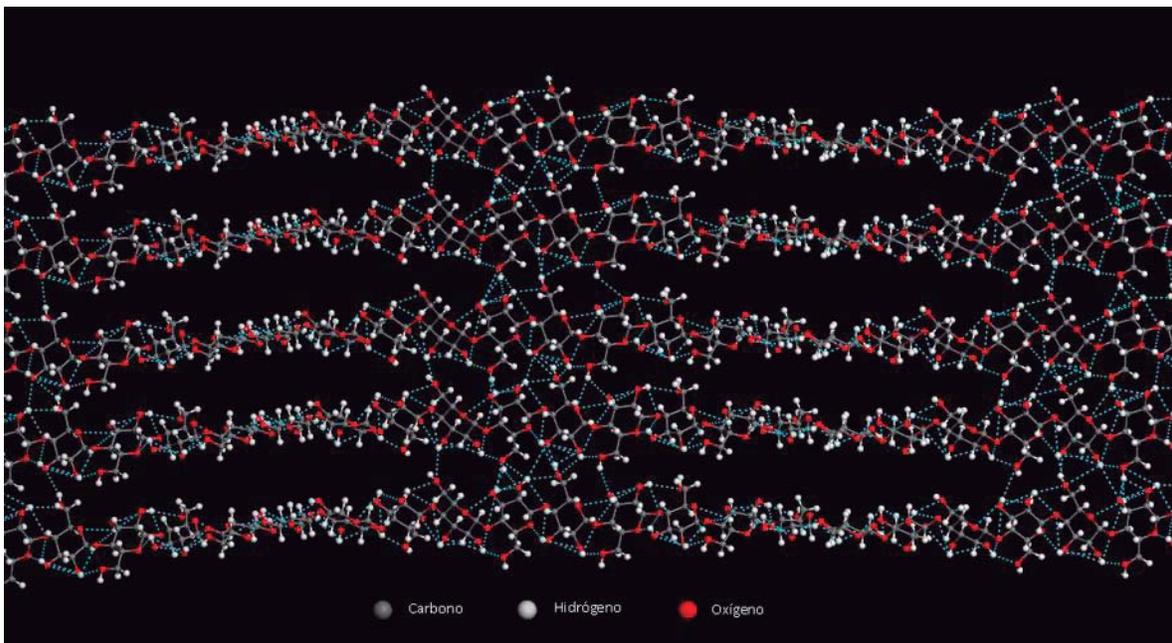


Fig. 4.85 Interacción por puentes de hidrógeno que se originan entre cadenas de celulosa.

En la Figura 4.85 es claro observar que a lo largo de la cadena de celulosa los grupos OH's tienden a orientarse fuera del plano de interacción molecular. Por esta razón, en la celulosa se encuentran gran cantidad de grupos hidroxilo libres de interacciones intermoleculares, que pueden ser importantes aportes de interacción externa. Sin embargo, de manera generalizada, persisten sólo las interacciones intramoleculares que no deforman significativamente la conformación individual de la cadena.

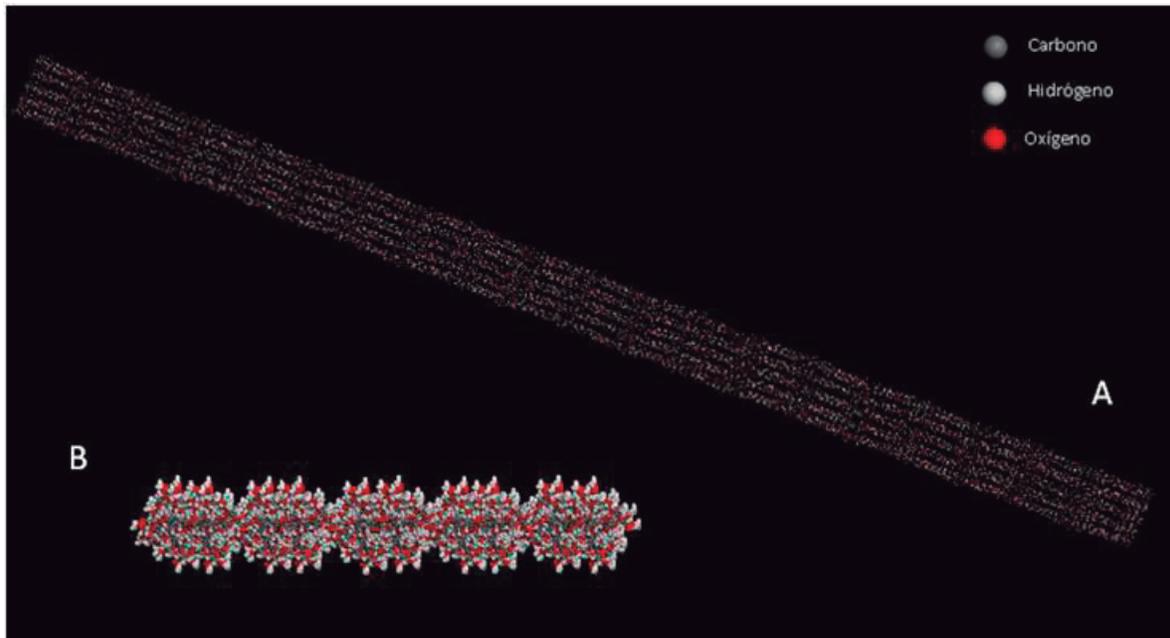


Fig. 4.86 Bloque con 10 cadenas de celulosa de 200 monómeros cada una, A) arreglo antiparalelo, B) sección transversal

En la vista transversal de la figura 4.86, se observa la posición de gran proporción de hidroxilos en la periferia del bloque, por lo que en la celulosa hay gran proporción de grupos polares expuestos. Adicionalmente las cadenas largas o grupos de ellas pueden rotar, interactuar con cadena vecinas y provocar su entrecruzamiento.

Simulación molecular de ácido carmínico

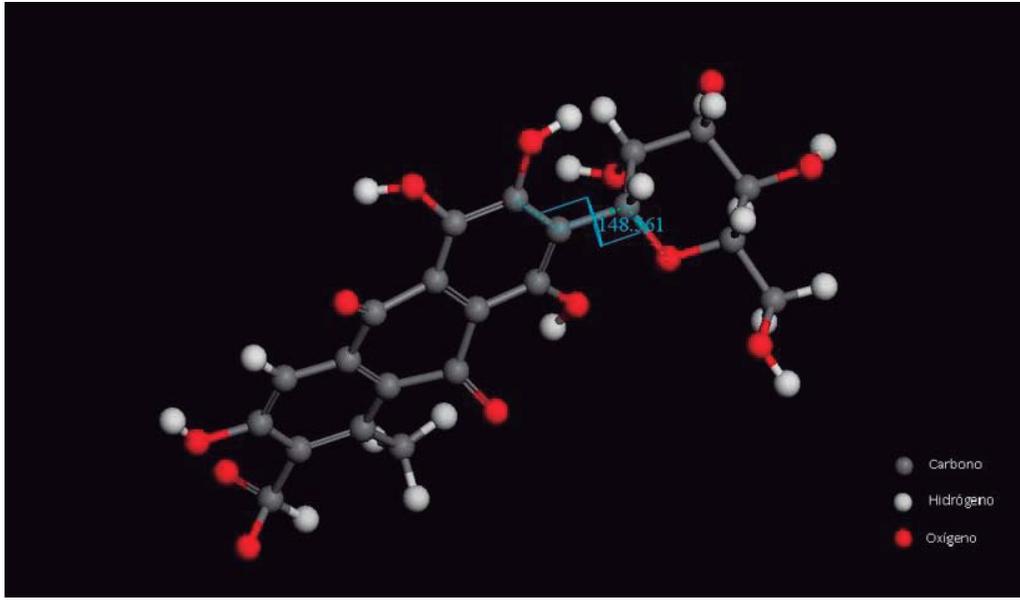


Fig. 4.87 Ácido carmínico.

Al simularse el ácido carmínico (Figura 4.87) éste exhibe algunas de sus condiciones conformacionales. Presenta un ángulo de torsión en -148.51° en el enlace entre la unidad de antraquinona y el carbohidrato que constituyen la molécula del AC. Así, inicialmente por la proximidad de los grupos OH's se puede establecer una alta interacción intramolecular. Para indicar este comportamiento y la competencia con las interacciones intermoleculares se llevó a cabo una simulación con un mayor número de moléculas.

La figura 4.88 muestra el modelo de 5 cadenas de 10 monómeros. Al incrementarse las moléculas de AC, se conforman en cadenas en paralelo con una torsión del carbohidrato en cada molécula, originando pliegues e interacciones por puentes de hidrógeno. Así, es posible observar zonas altamente planas favorecidas por la disposición que presenta los dos grupos aromáticos en la molécula del AC.

La interacción intermolecular por OH's entre las moléculas del AC, favorece en gran medida la posibilidad de enlaces fuertes entre estas moléculas. En gran medida se

sustituyen las posibles interacciones intramoleculares del AC por las intermoleculares, logrando así que se registren agregaciones entre ellas.

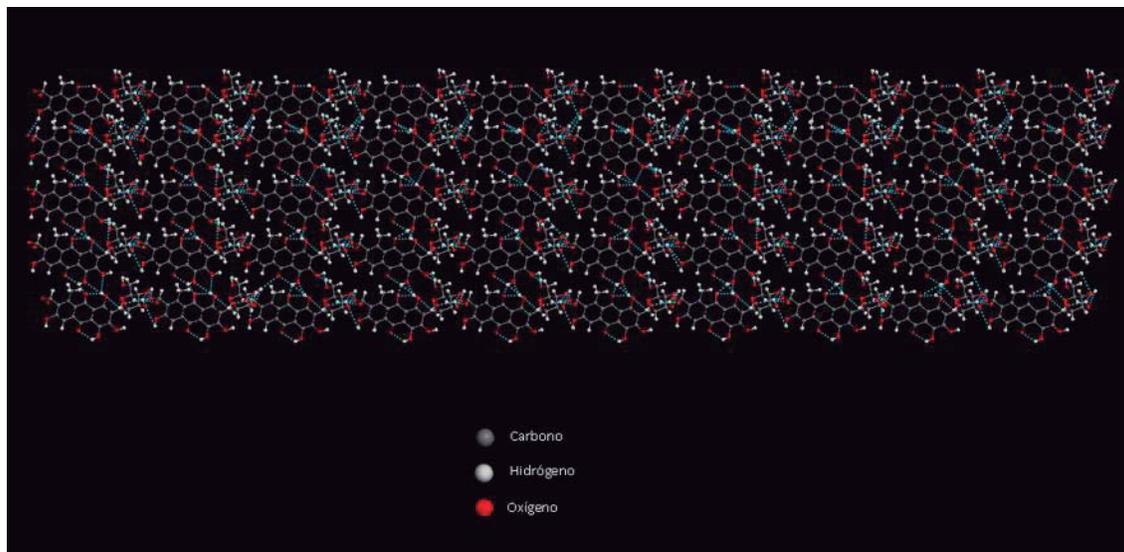


Fig. 4.88 Interacción por puentes de hidrógeno que se origina entre moléculas de ácido carmínico.

En la figura 4.89 se observa con mayor detalle la orientación de los grupos hidroxilos y los carbonilos en los anillos aromáticos generando atracciones por puentes de hidrógeno intermoleculares. En este acercamiento es posible observar las atracciones intramoleculares que presenta principalmente el grupo carbonilo (de la fracción cíclica) con los grupos hidroxilos adyacentes.

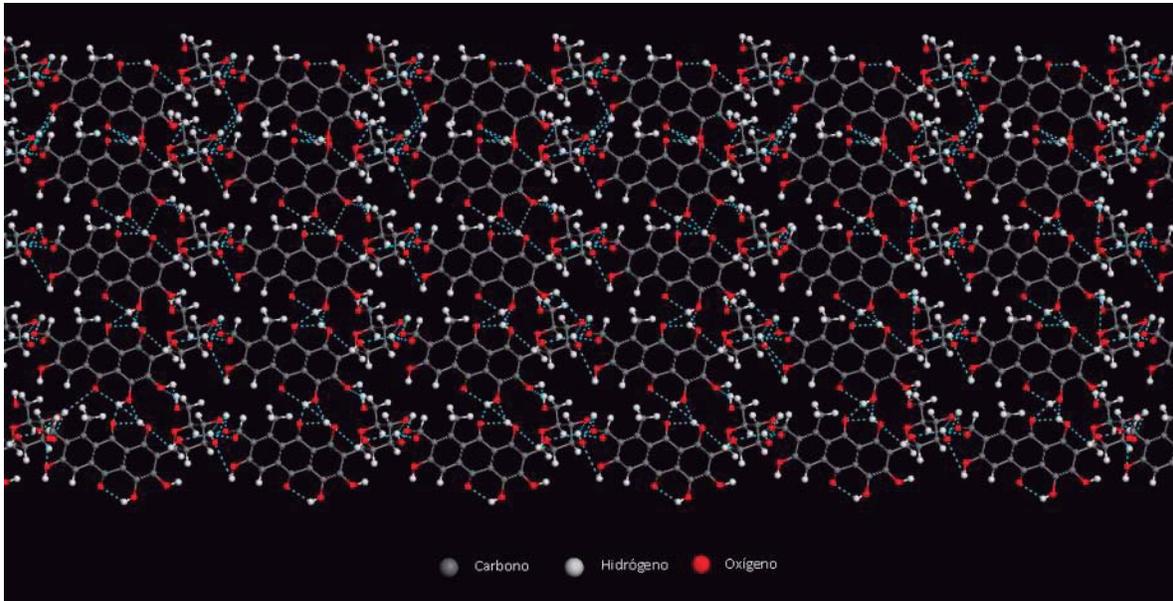


Fig. 4.89 Interacción por puentes de hidrógeno entre moléculas de ácido carmínico (acercamiento de la figura 4.88)

En el arreglo antiparalelo y la sección transversal de las moléculas de AC que se aprecia en la Figura 4.90, se observa a los grupos hidroxilos expuestos y en mayor proporción los del azúcar. Así también se originan huecos intermoleculares debido a la conformación voluminosa de las antroquinonas por la interacción entre el $C=O \dots H-O$ que se está llevando a cabo al interior de cada molécula.

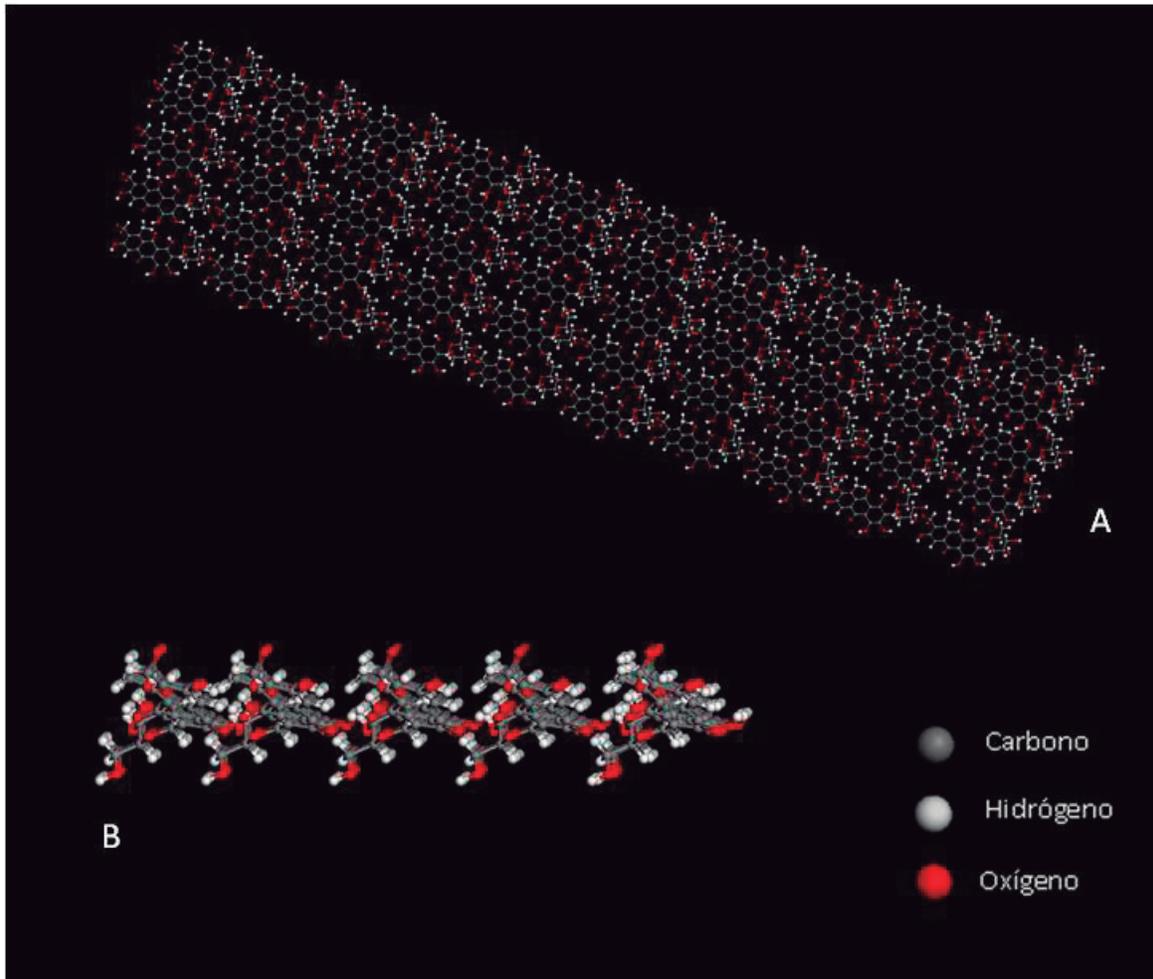


Fig. 4.90 Cincuenta moléculas de AC, A) arreglo antiparalelo, B) sección transversal.

Simulación molecular de celulosa y ácido carmínico (AC)

Las Figura 4.91 corresponde al análisis que representa la interacción entre moléculas celulosa y AC. En este proceso se generaron 2 cadenas de celulosa de 10 monómeros cada una y 8 moléculas de AC, para valorar su interacción.

Se puede observar las interacciones intramoleculares en el AC a partir de los grupos OH's del azúcar y los grupos carbonilos en la misma molécula.

Las interacciones intermoleculares entre la celulosa y el AC corresponden a puentes de hidrógeno que se generan principalmente entre los grupos C=O (de la fracción aromática) y

grupos OH's de del AC y los hidroxilos de la celulosa alternándose estos en las unidades de glucosa. Así el enlace glucosidico participa de igual manera que lo hacen los OH's de la molécula de celulosa en la interacción intermolecular. Debido a lo anterior, se espera una modificación en la conformación de la molécula de celulosa por la acción del AC.

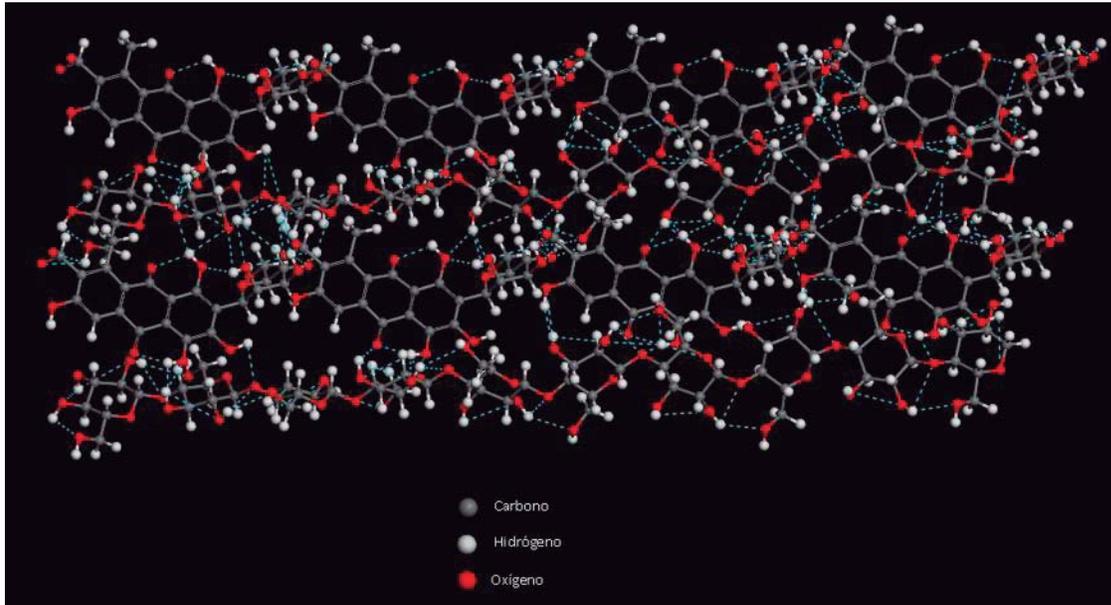


Fig. 4.91 Interacción por puentes de hidrógeno entre celulosa (2 cadenas de 10 monómeros cada una) y AC (8 moléculas).

Debido a la condición planar que muestran las fracciones aromáticas, algunos de sus grupos ácidos y carboxilos no interaccionan con los grupos polares de la celulosa, por lo que es posible apreciar que la interacción no participan todos los grupos disponible del AC. Incluso es posible apreciar en la parte superior izquierda que no existen interacciones de los grupos terminales de las fracciones aromáticas (OH, COOH).

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron nanopartículas del tamaño deseado, libres de impurezas y con un rendimiento del 83.92%, esto respalda la factibilidad de la obtención y uso de nanopartículas de celulosa en nanotecnología y envases inteligentes.
- Mediante películas de celulosa, se obtuvieron matrices con 2 tamaños de fibra libres de impurezas y con características idóneas para ser inter-penetradas por el colorante.
- En las películas de celulosa con ácido carmínico, por observación directa se concluye: a) en el proceso por inmersión las películas con mayor intensidad en color se obtuvieron a 0.5wt% de AC y mayor resistencia en disolución acuosa. b) Por el proceso *in situ* las películas por disolución ácida requirieron menor concentración de AC 0.1 wt% para obtener películas homogéneas y con mayor resistencia a 0.5wt%.
- Por SEM, se determina que los sistemas en disolución ácida promueven la ruptura de las fibras. Generando mayor número de sitios terminales, las cuales son de mayor interacción con el ácido carmínico debido a las áreas de contacto, en donde hay mayor infusión del ácido carmínico, esto fue más evidente en el proceso *in situ*.
- Los resultados por FTIR indican una proximidad con aquellos obtenidos por SEM. Debido a que las señales por IR del grupo OH muestra desplazamientos promovidos por una mayor interacción de los grupos polares entre la celulosa y el ácido carmínico en el método *in situ*.
- Por luminiscencia se determinó que el método que genera una mejor y mayor coloración en las películas es el método *in situ*.
- Con respecto a los análisis por SEM y AFM, se determinó que el ácido carmínico favorece la formación de aglomerados conforme aumenta la concentración, esto de una forma mucho más notoria en el proceso por inmersión, ya que en la integración *In situ*, el ácido carmínico se integra de forma más homogénea y los aglomerados son de tamaño nanométrico, atribuyéndose a una integración por absorción.

- Los resultados por FTIR indican una proximidad con aquellos obtenidos por SEM. Las señales de IR por el proceso por inmersión muestran que existe una mayor interacción intramolecular a la concentración de 0.5wt%, a diferencia de la integración In situ donde la intensidad de las señales son acorde a la concentración manejada.
- En la evaluación por UV-VIS y Luminiscencia de las tres matrices de celulosa con AC sometidas a temperatura y humedad, se concluye que las moléculas de AC se disocian en las matrices provocando un incremento en la intensidad de color por efecto de la temperatura y humedad. Por lo que el AC conserva su funcionalidad.
- La simulación molecular corroboró los resultados experimentales, con respecto a la existencia de interacciones intra e intermoleculares en los sistemas analizados. La celulosa mostró una linealidad molecular y plana, indicativos de la cristalinidad de la celulosa. Presentó hidroxilos libres e interacciones intramoleculares que no deforman la cadena.
- Para el AC las interacciones intermoleculares por OH's entre las moléculas favorecen las agregaciones entre ellas, a su vez las interacciones intramoleculares se presentaron por los grupos C=O y los grupos OH's adyacentes.
- Para el sistema Cel-AC se observaron interacciones intermoleculares debido a puentes de hidrógeno y se observó una modificación en la conformación de la molécula de celulosa por efecto del AC.

BIBLIOGRAFÍA

AESAN (2010). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los envases activos e inteligentes. N° de referencia: AESAN-2010-011. Revista del Comité Científico. 13, 89 – 105.

Aguirre R. Ma., Herranz N. (2008) ITENE. Godella, España. Revista Infopack, N° 137, 30 – 40.

Ahrensted N. Lage (2007). “Surface Modification of cellulose Materials from Wood Pulps to Artificial Blood Vessels”. Tesis de licenciatura. Royal Institute of Technology. Alba Nova University Centre. Stockholm.

Almengor Leticia (2009). “Nanotecnología en la industria alimentaria”. Revista electrónica N° 13, 37 – 52.

Appendini P., Hotchkiss J.H. (2002). “Review of antimicrobial food packaging”. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 3 (2) pp. 113-126.

Askeland, D.R. (1998). “Ciencia e Ingeniería de los Materiales”. 3ª ed. International Thomson Editores. México. pp 449-507.

Bataller Leiva Esther, Córcoles Tamarit Pilar, Rojo Iranzo Andrés. (2005). “Etiquetas activas en el mercado de frutas y hortalizas”. Revista Horticultura. 182, 30 – 31.

Beatriz Cabrera Rosa. (2005). “Downstream Processing of Natural Products: Carminic Acid”. Tesis para obtener el grado de Doctor de Filosofía. International University Bremen.

Brundle C. Richard, Evans Charles A., Wilson Shaun. (1992). "Materials characterization series: surfaces, interfaces, thin films". Series Editors: C. Richard Brundle and Charles A. Evans, Jr.

Cabrera R. (2005). "Downstream Processing of Natural Products: Carminic Acid". Tesis Doctor of Philosophy, School of Engineering and Science. International University Bremen. Alemania. Capítulos 1 y 2.

Carvalho P.R.N, Collins C.H. (1997). "HPLC determination of carminic acid in foodstuffs and beverages using diode array and fluorescence detection". *Chromatographia* Vol.45. 63-65.

Cañamares M., García J., Domingo C., Sánchez S. (2006). "Surface-enhanced Raman Scattering Study of the Anthraquinone Red Pigment Carminic Acid". *Journal Vibrational Spectroscopy*. Vol. 40,161 – 167.

Dainelli D., Gontard N., Spyropoulos D., Van den Beuken E.Z., Tobbac P. (2008). "Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns". *Trends in Food Science and Technology*. 19 (S1), 103 – 112.

Derecskei B., Derecskei-Kovacs A. (2006). "Molecular dynamic studies of the compatibility of some cellulose derivatives with selected ionic liquids".

Diaz Flores L, Luna Barcenas G. (2005). "Preparation and optical properties of SiO₂ Sol-Gel made glass colored with carminic acid. *Journal of Sol-Gel Science and technology*". 33,261 – 267.

Edelstein E. A., Cammarata R. C. (1998). "Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications". Institute of Physics Publishing, London.

Fain V. Ya, Zaitsev B. E., Ryabov M. A. (2007). “Tautomerism and Ionization of carminic acid”. *Russian Journal of General Chemistry*. Vol. 77.Nº 10, 1769 – 1774.

Fernández Q.J.D., Vásquez G.S.R., Flores R.N., Luna B.G., Gutiérrez A.O. (2009). “Síntesis y caracterización de matrices orgánicas e inorgánicas conteniendo pigmentos naturales”. *Suplemento de la Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*. SI (3): 1243 – 1247.

Flores V. (1996). “Cosecha y Postcosecha de Cochinilla en la sierra del Perú”. I Seminario Internacional de la Cochinilla. Perú.

Gennadios A. (2002). “Protein-based films and coating”. Ed. A. Gennadios. CRC Press LLC, USA.

Ghosh V., Ziegler G.R., Anantheswaran R.C. (2002). “Fat, moisture and ethanol migration through chocolates and confectionary coating”. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 42 (6): pp 583-626.

Gibaja Oviedo Segundo, Salaverry García Oswaldo (1998). “Pigmentos naturales quinónicos”. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Fondo Editorial.

Granda Valdés M., Valdés González A., García Calzón J., Díaz García M. (2009). “Analytical nanotechnology for food analysis”. *Microchim Acta*, 166, 1–19.

Granja P.L., Barbosa M.A. (2001). “Cellulose phosphates as biomaterials. Mineralization of chemically modified regenerated cellulose hydrogels”. *Journal of Materials Science* 36: 2163-2172.

Han J.H. (2000). “Antimicrobial food packaging”. *Food Technology*. 54 (3): pp 56-65.

Hernández Ruiz Maydel. (2005). Evolución de los envases inteligentes en la industria alimentaria. Facultad de Química-Alimento. Universidad de Camagüey, Cuba.

Hon N.S. David, Shiraishi Nobou. (2001). Wood and Cellulosic Chemistry. Revised and expanded. Second edition. Marcel Dekker Inc. New York. pp 51-83, 331-51.

Ibarra I. Loera S., Laguna H., Lima E. y Lara V. (2005). “Irreversible Adsorption of an Aztec Dye on Fractal Surfaces”. Chemistry of Materials. Editorial ACS. Vol. 17, pp. 5763 - 5769.

Ibarra Alvarado Ilich Argel (2005). “Preparación y caracterización de sólidos cromóforo-matriz inorgánica”. Tesis de Licenciatura en Química. Universidad Autónoma Metropolitana.

Keyser, C. A. (1985). “Ciencia de Materiales para Ingeniería”. 1ª edición. Editorial Limusa. México. pp 341–383.

Khor Eugene (2001). “Fulfilling a Biomaterials Promise”. Elsevier Science Ltd, New York.

Libby Earl C. (1981). “Ciencia y Tecnología de Pulpa y Papel”. CECSA. México.

Mejía Castillo Teresa, Mújica Lengua Fidel, González Robles Arturo, Ortega López Jaime. (2002). “Proteínas con afinidad a celulosa: una herramienta en biotecnología”. Avance Perspectivo vol. 21. XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería.

Méndez J., González M., Lobo M. y Carnero A. (2004). “Color Quality of Pigments in Cochineals (*Dactylopius coccus* Costa). Geographical Origin Characterization Using Multivariate Statistical Analysis”. Journal of Agricultural and Food Chemistry. pp 1331 – 1337.

Misra P. y M. Dubinskii. (2002). "Ultraviolet Spectroscopy and UV Lasers". Editorial Marcel Dekker Inc. E.U.A. pp. 1 – 6, 12 – 19, 133.

Moncada Acevedo Edwin. (2006). "Nanotecnología y Nanocompositos". Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Revista 29, 1 -13.

Morrison Robert T. y Boyd Robert N. (1998). "Química Orgánica". 5a edición, Editorial Pearson Educación. México.

Nicholson, J. W. (2006). "The Chemistry of Polymers". 3rd ed. University of Greenwich. ISBN 0-85404-684-4.

Odian, G. (2004). "Principles of Polimerization". Fourth edition. Wiley Interscience, USA. pp 745-747.

Olabarrieta I. (2005). "Strategies to improve the aging, barrier and mechanical properties of chitosan, whey and wheat gluten protein films". KTH Chemical Science and Engineering. Stockholm.

Olivas, G.I., Barbosa-Canovas, G.V. (2005). "Edible coatings for fresh-cut fruits". Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45(7-8):657-670.

O'Sullivan Antoinette C. (1997). "Cellulose: the structure slowly unravels". Cellulose 4: 173-207.

Panadero S., Gómez Hens A., Pérez Bendito D. (1997). "Kinetic determination of carminic acid by its inhibition of lanthanide-sensitized luminiscence". Fresenius J. Anal. Chem. 357: 80 – 83.

Pérez J. (1992). “Anteproyecto de una planta procesadora de grana de cochinilla para la obtención de sus principales derivados: Extracto de cochinilla, carmín de cochinilla y ácido carmínico”. Tesis Escuela de Química, Universidad de La Salle. México. pp 137.

Rasmus J., Berglund K., Blanchard G. (1996). “A molecular lock-and-key approach to detecting solution phase self-assembly. A fluorescence and absorption study of carminic acid in aqueous solutions”. *The Journal of Physical Chemistry*. Vol 100, 7220 – 7229.

Rouessac Francis, Rouessac Annick. (2003). “Análisis químico, métodos y técnicas instrumentales modernas”. Editorial McGraw Hill. España.

Sáenz C., Garrido J. y Carvallo M. (2004). “Colorantes Naturales derivados de la Cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa)”. *La alimentación latinoamericana*. pp. 56 – 62.

Siqueira G., Tapin-Lingua S., Bras J., Da Silva Pérez D., Dufresne A. (2010). “Morphological investigation of nanoparticles obtained from combined mechanical shearing, and enzymatic and acid hydrolysis of sisal fibers”. *Cellulose* 17:1147-1158.

Sjöström Eero. (1993). “Wood Chemistry, Fundamentals and Applications”. Second edition. Academic Press, USA. pp 54-58.

Skoog Douglas, Leary James. (1995). “Análisis instrumental”. Editorial McGraw-Hill. Cuarta edición. México.

Sócrates G. (1994). “Infrared characteristic groups frequencies”. Segunda edición.

Sperling L. H. (2006). “Introduction to Physical Polymer Science”. Fourth edition. John Wiley and Sons Publications.

Sugimoto N. (2002). “Structure of acid-stable carmine”. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. Vol. 43, 18 – 23.

Terry Leon A., White Stephen F., Tigwell Linda J. (2005). “The Application of Biosensors to Fresh Produce and the Wider Food Industry”. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1309-1316.

UE (2004). Reglamento (CE) N° 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE. DO L 338 de 13 de noviembre de 2004, pp: 4-17.

UE (2009). Reglamento (CE) N° 450/2009 de la Comisión, de 29 de mayo de 2009, sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos. DO L 135 de 30 de mayo de 2009, pp: 3-11.

Wade I.G.Jr. (2004). “Química orgánica”. Quinta edición. Editorial Pearson Prentice Hall. España.

Wang Jing, Somasundaran P. (2005). “Adsorption and conformation of carboxymethyl cellulose at solid-liquid interfaces using spectroscopic, AFM and allied techniques”. *Journal of Colloid and Interface Science.* 291, 75 – 83.

Weber, C.J. (2000). “Biobased Packaging Materials for the Food Industry”. Publicado en www.alimentatec.com

Weiss J., Takhistov P., McClements J. (2006). “Functional Materials in Food Nanotechnology”. *Journal of Food Science.* Vol. 71, 9 R107-116.

Zuluaga Robin, Putaux Jean-Luc, Restrepo Adriana, Mondragón Iñaki, Gañán Piedad. (2007). “Cellulose microfibrils from banana farming residues: isolation and characterization”. *Cellulose* 14: 585-592.

Página web: <http://accelrys.com/products/materials-studio/>