



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

AREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**“Astaxantina Integrada en Nanowhiskas de Quitina:
Estudio de la Degradación Térmica”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

IBQ. Violeta Campos Cornelio

DIRECTOR:

Dra. Nelly Flores Ramírez

Co-DIRECTOR: Dr. Salomón Ramiro Vásquez García

Morelia Michoacán

Agosto 2016



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DR. HÉCTOR GUILLÉN ANDRADE
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E


Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Astaxantina Integrada en Nanowhiskas de Quitina: Estudio de la Degradación Térmica", presentado por la IBQ. Violeta Campos Cornelio, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

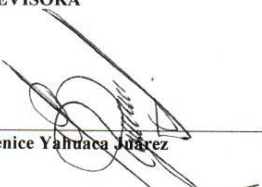
Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE


Morelia, Michoacán, a 07 julio de 2016

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Nelly Flores Ramírez
Asesora


Dra. Berenice Yahuaea Juárez


Dra. Lada Domratcheva Lvova


Dr. Salomón Ramiro Vásquez García


Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores

RESUMEN

Astaxantina Integrada en Nanowhiskas de Quitina: Estudio de la Degradación Térmica

Por: IBQ.Violeta Campos Cornelio.

Dirigida por: Dra. Nelly Flores Ramírez
Co-Dirigida por: Dr. Salomón R. Vásquez García

Entidad: Posgrado Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Agosto 2016

La quitina puede utilizarse como materia prima para la elaboración de nanocristales en forma de nanowhiskas. A través de la estructura molecular y la formación de nanowhiskas de quitina se mejoran propiedades mecánicas y la disponibilidad de los materiales, una importante aplicación de los nanowhiskas es la encapsulación de compuestos activos, como la astaxantina el cual es un carotenoide con gran actividad antioxidante superando a otros, sin embargo se descompone fácilmente cuando se expone a calor, luz y oxígeno. En el presente estudio se obtuvieron nanowhiskas de quitina (NWQ) por medio de un sistema acuoso de NaOH/urea con tratamientos de congelación-descongelación y dos mecánicas de agitación mecánica y ultrasonido. En la primera etapa se formaron NWQ para en una segunda etapa incorporar la astaxantina (Ast) en dos concentraciones, formando el complejo NWQ-Ast. Los NWQ-Ast con mayor concentración de astaxantina en los dos métodos de obtención, presentaron interacciones intermoleculares por puentes de hidrogeno entre la quitina y la astaxantina. A su vez, los NWQ con menor concentración de astaxantina presentaron el mayor porcentaje de cristalinidad, homogeneidad en los tamaños de partícula, y una mejor estabilidad térmica. Microscopia laser confocal de barrido, muestra que menores concentraciones de astaxantina tienen una mayor dispersión en la matriz de quitina, independientemente del método de obtención de los NWQ. Finalmente, los NWQ obtenidos tienen la capacidad de albergar astaxantina sin afectar su funcionalidad, además de proveer un soporte con alta estabilidad térmica.

Palabras claves: nanowhiskas, quitina, astaxantina, degradación y temperatura.

ABSTRACT

Astaxanthin Incorporated in Chitin Nanowhiskers: A Thermal Degradation Study

By Violeta Cornelio Campos

Directed by Dra. Nelly Flores Ramírez

Co-Directed by Dr. Salomon R. Vásquez García

Department: Postgraduate Institutional Program of Master in Biological Sciences

August 2016

Chitin can be used as raw material for preparation of nanocrystals in the nanowhiskers form. By modifying the molecular conformation of chitin, chitin nanowhiskers (CNW) are obtained, which improved its thermal and mechanical properties. An important application of nanowhiskers is the encapsulation of active compounds such as astaxanthin (Ast), which is a carotenoid with a high antioxidant activity. However this carotenoid is easily degraded when is exposed to heat, light and oxygen. In the present study CNW were obtained through the dissolution of chitin in aqueous NaOH/urea by cyclic freezing and thawing. The two dissolution treatment were used; mechanical stirring and ultrasound. In the first step the CNW was obtained, in the second step the Ast was added at two different concentrations, forming the CNW-Ast sample. The CNW-Ast sample with the highest Ast concentration exhibited the highest intermolecular interactions as consequence of hydrogen bonds; this was independent of the dissolution treatment. On the other hand, the CNW-Ast sample with the lowest Ast concentration showed the highest degree of polymer crystallinity with homogeneous particles size with higher thermal stability. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) shows there is greater Ast dispersion in the chitin matrix when the lowest Ast concentration was used. This result was completely independent from the dissolution treatment. Finally, CNW is a good matrix for the Ast, without modifying the basic chemical structure, and providing a matrix that improves the thermal stability.

Keywords: Nanowhiskers, chitin, astaxanthin, degradation y temperature.

DEDICATORIA

A mis hijas *Mónica Itzia* y *Violeta Fernanda* y a mi esposo *Francisco Omar* por ser la columna vertebral y demostrarme su cariño, confianza y gran apoyo en la culminación de esta meta.

A mis padres *María Mónica* y *Martín*, al igual que mis hermas *Jacaranda*, *Ma. Guadalupe*, *Ma. Salud* y *Ma. Mónica* y familias por estar siempre en ese momento con su cariño y gran apoyo incondicional.

En especial a Dios por esta oportunidad de vida en mi realización como persona y profesionista.

AGRADECIMIENTOS

De manera especial a la Dra. Nelly Flores Ramírez por toda la confianza y apoyo mostrados desde un inicio y durante la realización del presente trabajo.

Al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas de la UMSNH por haberme aceptado en su posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios.

A los miembros de mi comité de tesis: Dra. Berenice Yahuaca Juárez, Dra. Lada Domratheva Lvova, al Dr. Salomón Ramiro Vásquez García y Dr. Hector Eduardo Martínez Flores por sus consejos y aportaciones en este trabajo.

Un agradecimiento especial al Dr. Juan José Valdez por aporte y las facilidades otorgadas en el laboratorio del CMEB de la UMSNH para la realización de microscopía laser confocal de barrido.

Al Dr. Leandro García González por su apoyo y colaboración en el proceso de caracterización en MICRONA de la Universidad Veracruzana.

A la Dra. Arlette Arizbe Santiago de la Cruz por su amistad, consejos y conocimientos.

A mi amiga Lili, Jael, Lupita y a todos mis compañeros de laboratorio y demás personas que han hecho posible que cumpla mis objetivos.

ÍNDICE

CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
DEDICATORIA.....	5
AGRADECIMIENTO.....	6
INDICE.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABLAS.....	12
NOMENCLATURA.....	13
GLOSARIO.....	14
CAPITULO 1.....	15
1.1 INTRODUCCIÓN.....	15
1.2 OBJETIVOS.....	16
1.3 JUSTIFICACIÓN.....	17
1.4 HIPOTESIS.....	18
CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO.....	19
2.1 Nanotecnología.....	19
2.2 Polisacáridos Y Nanoestructuras.....	19
2.2.1 Quitina.....	20
2.2.1.1 Estructura molecular de la quitina.....	20
2.2.2 Nanowhiskas.....	21
2.2.2.1 Métodos de obtención.....	21
2.2.2.2 Propiedades.....	21
2.2.3 Nanowhiskas de quitina.....	22
2.2.3.1 Obtención de NWQ.....	22
2.2.3.2 Aplicaciones.....	22
2.3 Astaxantina.....	23
2.3.1 Estructura molecular.....	24
2.3.2 Propiedades y aplicaciones.....	24

2.3.3 Desventajas de la astaxantina.....	25
2.4 Técnicas de caracterización.....	25
2.4.1 Microscopía óptica (MO).....	25
2.4.2 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	26
2.4.3 Microscopía Laser Confocal de Barrido.....	26
2.4.4 Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR).....	27
2.4.5 Difracción de Rayos X (DRX).....	27
2.4.6 Tamaño de partícula.....	28
2.4.7 Análisis termogravimétrico (TGA/DTG).....	28
2.4.8 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	29
2.4.9 Capacidad antioxidante.....	29
2.4.9.1 Porcentaje de inhibición.....	30
CAPITULO 3. METODOLOGÍA.....	31
3.1 Reactivos y solventes.....	31
3.2 Formación de nanowhiskas de quitina (NWQ).....	32
3.2.1 Modelo propuesto entre la quitina y el solvente(NaOH-Urea-H ₂ O)	34
3.3 Incorporación <i>in situ</i> de astaxantina en los NWQ.....	34
3.4 Técnicas de caracterización.....	35
3.4.1 Microscopía Óptica (MO).....	35
3.4.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	36
3.4.3 Microscopía Laser Confocal de barrido.....	36
3.4.4 Espectroscopia de infrarrojo (FTIR).....	36
3.4.5 Difracción de rayos X (DRX).....	37
3.4.6 Tamaño de partícula.....	37
3.4.7 Análisis Térmico (TGA&DSC).....	37
3.4.8 Capacidad antioxidante por el método DPPH (% de inhibición).....	38
CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1 Microscopía óptica (MO).....	39
4.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	39
4.3 Microscopía laser confocal de barrido.....	43

4.4 Espectroscopía Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).....	46
4.5 Difracción de Rayos X (DRX).....	52
4.6 Tamaño de partícula.....	62
4.7 Análisis Termogravimétrico (TGA).....	63
4.8 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	65
4.9 Porcentaje de inhibición.....	68
CAPITULO 5. CONCLUSIONES.....	70
5.1 Propuestas.....	72
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Estructura de la quitina.....	20
Figura 2.2 Nanowhiskas.....	21
Figura 2.3 Descripción del modelo de cadena de quitina en solución acuosa NaOH.....	22
Figura 2.4 Aplicaciones de nanowhiskas.....	23
Figura 2.5 Estructura conformacional 3R.3'S de la astaxantina.....	24
Figura 3.1 Diagrama de obtención de nanowhiskas de quitina (NWQ).....	33
Figura 3.2 Esquema del modelo propuesto de la quitina en solución acuosa con el solvente.....	34
Figura 3.3 Microscopio óptico marca Leica DRM-XA.....	35
Figura 3.4 Microscopio Confocal Laser de Barrido.....	36
Figura 3.5 Reporte PDF de equipo NanoSight.....	37
Figura 3.6 Equipo NETZSCH STA 449 F3 Jupiter.....	37
Figura 3.7 Espectrofotómetro UV.....	38
Figura 4.1 Microscopía por MO.....	39
Figura 4.2. Micrografía por MEB de QS.....	39
Figura 4.3. Micrografía por MEB de NWQ_{AMEC}	40
Figura 4.4 Micrografía por MEB de $NWQ-AST_{AMEC-C1}$	40
Figura 4.5. Micrografía por MEB de $NWQ-AST_{AMEC-C2}$	45
Figura 4.6. Micrografía por MEB de NWQ_{US}	42
Figura 4.7. Micrografías por MEB de NWQ_{US-C1}	42
Figura 4.8. Micrografías por MEB de NWQ_{US-C2}	43
Figura 4.9. Imágenes por Microscopía Confocal de QS.....	44
Figura 4.10. Imágenes por Microscopía Confocal de $NWQ-Ast_{AMEC-C1}$	44
Figura 4.11. Imágenes por Microscopía Confocal de $NWQ-Ast_{AMEC-C2}$	45
Figura 4.12. Imágenes por Microscopía Confocal de $NWQ-Ast_{US-C1}$	45
Figura 4.13. Imágenes por Microscopía Confocal de $NWQ-Ast_{US-C2}$	46
Figura 4.14. Espectro FTIR de QS.....	47
Figura 4.15. Espectro FTIR de NWQ_{AMEC}	47
Figura 4.16 Espectro FTIR $NWQ-Ast_{AMEC-C1}$	48
Figura 4.17 Espectro FTIR $NWQ-Ast_{AMEC-C2}$	48
Figura 4.18 Espectro FTIR de NWQ_{US}	50
Figura 4.19 Espectro FTIR $NWQ-AST_{US-C1}$	51
Figura 4.20 Espectro FTIR $NWQ-AST_{US-C2}$	51
Figura 4.21. Difractograma RX de QS.....	53
Figura 4.22. Difractograma RX de NWQ_{AMEC}	54
Figura 4.23 Difractograma RX de $NWQ-Ast_{AMEC-C1}$	55
Figura 4.24 Difractograma RX de $NWQ-Ast_{AMEC-C2}$	56
Figura 4.25. Difractograma RX de NWQ_{US}	58
Figura 4.26 Difractograma RX de $NWQ-Ast_{US-C1}$	59
Figura 4.27 Difractograma RX de $NWQ-Ast_{US-C2}$	61
Figura 4.28. Curva TG-DTG de Quitina pura.....	63
Figura 4.29 Curva TG-DTG de Quitina Solvatada.....	63

Figura 4.30 Curva TG-DTG de NWQ-Ast _{A.MEC-C1}	64
Figura 4.31 Curva TG-DTG NWQ-Ast _{A.MEC-C2}	64
Figura 4.32 Curva TG-DTG NWQ-Ast _{US-C1}	65
Figura 4.33 Curva TG-DTG de NWQ-Ast _{US-C2}	65
Figura 4.34 Curva DSC de Quitina pura.....	66
Figura 4.35 Curva DSC de QS.....	66
Figura 4.36 Curva DSC de NWQ-Ast _{A.MEC-C1}	67
Figura 4.37 Curva DSC de NWQ-Ast _{A.MEC-C2}	67
Figura 4.38 Curva DSC de NWQ-Ast _{US-C1}	67
Figura 4.39 Curva DSC de NWQ-Ast _{US-C2}	67

LISTA DE TABLAS

Tabla 4.1 Bandas características por FTIR para NWQ _{AMEC} , Ast y NWQ-Ast _{AMEC-C1}	48
Tabla 4.2 Bandas de absorción características por FTIR para NWQ-Ast _{AMEC-C2}	49
Tabla 4.3 Bandas de absorción características por FTIR para NWQ-Ast _{US-C1}	51
Tabla 4.4 Bandas de absorción características por FTIR para NWQ-Ast _{US-C2}	52
Tabla 4.5 Patrones PDF de la α -quitina.....	53
Tabla 4.6 Patrones PDF de la urea.....	53
Tabla 4.7 Patrones PDF del NaOH.....	53
Tabla 4.8 Patrones PDF de la α -quitina.....	54
Tabla 4.9 Patrones PDF de la urea.....	54
Tabla 4.10 Patrones PDF de la Trona.....	55
Tabla 4.11 Patrones PDF de la urea.....	55
Tabla 4.12 Patrones PDF de la α -quitina.....	56
Tabla 4.13 Patrones PDF de la α -quitina.....	57
Tabla 4.14 Patrones PDF de la urea.....	57
Tabla 4.15 Patrones PDF del NaOH.....	57
Tabla 4.16 Patrones PDF de la α -quitina.....	58
Tabla 4.17 Patrones PDF de la urea.....	58
Tabla 4.18 Patrones PDF de NaOH.....	58
Tabla 4.19 Patrones PDF de la trona.....	59
Tabla 4.20 Patrones PDF de la urea.....	60
Tabla 4.21 Patrones PDF de la α -quitina.....	60
Tabla 4.22 Patrones PDF de la trona.....	61
Tabla 4.23 Patrones PDF de la urea.....	61
Tabla 4.24 Patrones PDF de la α -quitina.....	61
Tabla 4.25 Tamaño de partícula QS, NWQ _{AMEC} , NWQ _{US}	62
Tabla 4.26 Tamaño de partícula NWQ-Ast _{AMEC-C1,C2} y NWQ-Ast _{US-C1,C2}	62
Tabla 4.27 Porcentaje de inhibición de NWQ-Ast _{US-C1}	68
Tabla 4.28 Porcentaje de inhibición de NW-Ast _{US-C1}	69
Tabla 4.29 Resultados finales de % de inhibición.....	69

NOMENCLATURA

ast	astaxantina
NWQ	Nanowhiskas de quitina
AFM	Microscopia de fuerza atómica
NaOH	Hidróxido de sodio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
HDL	Lipoproteína de alta densidad
MO	Microscopia óptica
MEB	Microscopia electrónica de barrido
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier
DRX	Difracción de rayos X
TGA	Análisis Termogravimétrico
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
UV	Ultravioleta
QSol	Quitina solvatada en solución
QSt	Quitina solvatada como sólido transparente
AMEC	Agitación mecánica
US	Ultrasonido
NWQ _{AMEC}	Nanowhiskas de quitina por agitación mecánica
NWQ _{US}	Nanowhiskas de quitina por ultrasonido
C1	3.35×10^{-7} mol
C2	2.765×10^{-7} mol
NWQ-Ast _{AMEC-C1}	Nanowhiskas de quitina por agitación mecánica y C1 de astaxantina
NWQ-Ast _{AMEC-C2}	Nanowhiskas de quitina por agitación mecánica y C2 de astaxantina
NWQ-Ast _{US-C1}	Nanowhiskas de quitina por ultrasonido y C1 de astaxantina
NWQ-Ast _{US-C2}	Nanowhiskas de quitina por ultrasonido y C2 de astaxantina
KOH	Hidróxido de potasio
g	gramos
ml	mililitros
°C	Grados centígrados
N ₂	Nitrógeno
T _{amb}	Temperatura ambiente
rpm	Revoluciones por minuto
kHz	Kilohertz
h	Horas
in Hg	Pulgadas de mercurio
nm	nanómetros
µm	micrómetros

GLOSARIO

Capacidad calorífica: es la cantidad de calor requerida para elevar la temperatura en 1°C, la temperatura de una determinada cantidad de sustancia.

Cristalinidad: Empaquetamiento de las cadenas moleculares para producir una disposición atómica ordenada.

Depolimerización: Proceso donde los polímeros se descomponen por etapas perdiendo unidades de monómero en una reacción que es inversa a la polimerización.

Movimiento browniano: movimiento aleatorio que se observa en algunas partículas microscópicas que se hallan en un fluido.

Polímero: Molécula muy grande (macromolécula) constituida por unidades moleculares (monómeros) que se repiten

Solvatación: Proceso de asociación de moléculas de un disolvente con moléculas o iones de un soluto, donde se da la formación de interacciones entre estas dos especies. Durante la dispersión las moléculas del soluto son rodeados por moléculas de solvente.

Temperatura de transición vítrea (TG): Es la temperatura en la cual se da una transición térmica del estado vítreo a un estado ahulado, debido al movimiento de las cadenas; por lo tanto, hay un cambio en el comportamiento de las moléculas del polímero y este se reblandece adquiriendo cierta elasticidad y capacidad de deformación plástica pero sin fractura.

Vítreo: Es un estado donde la materia presenta una estructura cristalina fuertemente cohesionada, que forma una red molecular dispuesta en secuencias regulares que se repiten tridimensionalmente.

CAPITULO 1

1.1 INTRODUCCIÓN

El interés en este trabajo fue desarrollar whiskas de quitina a escala nanométricas que puedan albergar y proteger a la astaxantina. En recientes años, se han utilizado estrategias para la prevención de la degradación de moléculas funcionales esto a través de la nanoencapsulación o microencapsulación en matrices poliméricas. El uso de estos polímeros representa una barrera frente a elementos externos, y permite obtener excelentes propiedades mecánicas. La quitina es un polímero que debido a su estructura molecular, permite el desarrollo de mejores propiedades mecánicas a través de la formación de fibras o películas. La quitina como otros polisacáridos están constituidos por regiones cristalinas y amorfas, las regiones amorfas de estos son altamente susceptibles a la hidrólisis y pueden ser removidas dejando regiones cristalinas intactas; dependiendo de la fuente y método de extracción de regiones cristalinas de la biomasa se obtienen diferentes morfologías. La combinación de un material con procesos de obtención o modificación de los mismos, permite que estos ofrezcan una mayor disponibilidad de aplicación y desarrollo de nuevas propiedades, los nanomateriales son un ejemplo de ello (Jian. *et al.*, 2012).

Por otra parte, dentro de los materiales altamente sensibles a ser degradados por agentes externos se considera a la astaxantina, la cual es un carotenoide tipo xantofila que se usa como suplemento nutricional y agente antioxidante. Además previene enfermedades como el cáncer, las cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos. En experimentos previos se ha demostrado que la astaxantina tiene una mayor actividad antioxidante que otros carotenoides (Yuan., *et al.*, 2011). La astaxantina es una molécula altamente insaturada que se descompone fácilmente, por lo que diversos derivados de la astaxantina se han preparado con una mejor solubilidad o estabilidad mediante estrategias como microencapsulación. Por lo anterior en este trabajo la quitina fue seleccionada como la matriz de protección de la astaxantina.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GENERAL

Aportar a la astaxantina un sistema de protección ante los procesos de foto y termo degradación a través de su incorporación a nanowhiskas de quitina.

1.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener nanowhiskas de quitina.
- Determinar la asociación molecular de la astaxantina en nanowhiskas de quitina.
- Estudiar la morfología y comportamiento térmico del sistema astaxantina/quitina para conocer la interacción intramolecular e intermolecular del complejo.
- Establecer el nivel de degradación térmica del sistema astaxantina/quitina.
- Valorar las propiedades antioxidantes de la astaxantina en el sistema astaxantina/quitina.

1.3 JUSTIFICACIÓN

La astaxantina es un pigmento natural, ampliamente distribuido en la naturaleza y con importantes propiedades antioxidantes para su uso en la industria alimentaria, el área médica e industrial. Sin embargo, es una molécula altamente insaturada lo cual permite que se degrade con facilidad al ser expuesta al calor, luz y oxígeno, aunado a lo anterior presenta coloraciones intensas y una baja disolución y dispersión en medios acuosos, esto ha sido una limitante en sus aplicaciones.

La estabilidad de la astaxantina ha sido atendida a través de su incorporación por microencapsulación, formación de complejos y adición en emulsiones y suspensiones entre otros. La disponibilidad de la sustancia activa y su funcionalidad son factores a considerar al ser incluidos en sistemas de protección, de esta forma, que el desarrollo de materiales nanoestructurados promueve una alta disponibilidad de la astaxantina.

La quitina es un biopolímero que muestra una atractiva alternación con diversos materiales debido a sus propiedades fisicoquímicas, su estabilidad química, y por sus propiedades mecánicas. Además el uso de polímeros naturales, biocompatibles y degradables utilizados para obtener materiales funcionales es de gran relevancia para un desarrollo sustentable y conservación del ambiente.

Por lo que el desarrollo de nanowhiskas de quitina sugiere ser un sistema prometedor que permita incorporar compuestos bioactivos mejorando con ellos su biodisponibilidad y propiedades de suministro, creándose un agente protector ante su degradación por factores externos.

1.4 HIPÓTESIS

La astaxantina es altamente susceptible a procesos de degradación térmica y por luz entre otros, por lo que su integración a la quitina le permitirá mantener su estabilidad y potencializar su funcionalidad.

CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología es una rama de la ciencia que tiene su fundamento en el estudio de los fenómenos ocurridos a nanoescala y en los llamados nanomateriales, constituyendo un nuevo dominio científico que ha surgido para el diseño, fabricación y aplicación de nanoestructuras o nanomateriales, logrando el entendimiento fundamental de la relación entre las propiedades o fenómenos físicos y químicos y las dimensiones de los materiales; en donde por lo menos una de sus dimensiones se encuentra entre 1 y 100 nm. Estos representan una transición entre moléculas y átomos, y un material con dimensiones de sólido volumétrico. También los efectos de superficie son de gran importancia, ya que se tiene en las partículas pequeñas un incremento en áreas superficiales por unidad de volumen y en energías libres superficiales respecto a los sólidos volumétricos; debido a que los átomos de la superficie de las nanopartículas están menos “enlazados” que el resto de sus átomos, y su esfera de coordinación está incompleta, se incrementa su energía libre superficial afectando propiedades como temperatura de fusión y reactividad química.

2.2 POLISACÁRIDOS Y NANOESTRUCTURAS

Los polisacáridos forman parte de un grupo de moléculas conocidas como carbohidratos. Los polisacáridos como celulosa y quitina son polímeros de origen natural encontrados en la naturaleza en abundancia como bloques de construcción estructurales. Otros polisacáridos como almidón proporcionan energía solar almacenada en forma de azúcar para celdas de combustible. Como está indicado por la Red de Excelencia Europea de Polisacáridos (siglas en inglés EPNOE), las investigaciones sobre polisacáridos han atraído un enorme interés y entendimiento fundamental que impulsará el desarrollo de aplicaciones que no solo se limita a la sustitución de química a base de petróleo, sino también a la apertura de nuevos campos y mercados. Los polisacáridos naturales como celulosa, quitina y almidón están compuestos de regiones cristalinas y amorfas. Las regiones amorfas son altamente susceptibles a la hidrólisis y bajo condiciones controladas pueden ser removidas dejando regiones cristalinas intactas. Existen diferentes métodos para la extracción de regiones cristalinas de la biomasa.

2.2.1 QUITINA

La quitina es un biopolímero que se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza tanto en el reino animal como en el vegetal. En abundancia es el segundo biopolímero después de la celulosa. Se encuentra como componente estructural del exoesqueleto de crustáceos (cangrejo, camarón, langosta y calamar), en la cutícula de insectos, algas marinas y hongos (Tharanathan & Kittur, 2003). Los desechos de camarón además de quitina contienen proteínas, lípidos y pigmentos carotenoides (Cañipa y Durán, 1995). Su estructura molecular permite desarrollar excelentes propiedades mecánicas a través de la formación de fibras o películas.

2.2.1.1 ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA QUITINA

La quitina está formada por cadenas lineales de monómeros de glucopiranosas unidas por enlaces β -1,4. Su estructura química (Figura 2.1), es poli[(β -(1,4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranososa)]. Su estructura es muy parecida a la celulosa, lo que hace que tenga propiedades similares a ella, la configuración del enlace β -1,4 provoca una estructura rígida y sin ramificaciones.

La quitina se puede encontrar en tres polimorfismos (Mincea *et al*, 2012): α -quitina, β -quitina o γ -quitina dependiendo de las regiones cristalinas de las cadenas. α -quitina es, con mucho, la forma más estable y abundante porque ampliamente existe en una gran cantidad de organismos vivos tales como hongos y células de levadura paredes, krill, langosta, y los tendones de cangrejo y conchas, caparazones de camarones, y la cutícula del insecto.

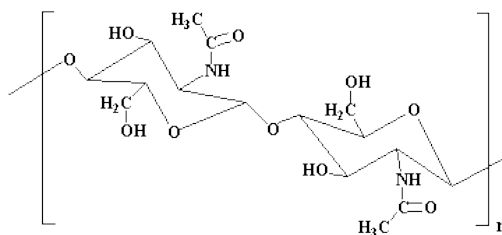


Figura 2.1. Estructura de la quitina

La quitina tiene excelentes propiedades incluyendo biocompatibilidad con tejidos vivos, biodegradabilidad, no toxicidad, propiedades de absorción, entre otras. Por lo tanto pueden ser ampliamente utilizada como material funcional en distintas áreas en aplicaciones biomédicas, de agricultura, de tratamiento de aguas, cosméticas y de alimentos (Zeng . *et al.*, 2012).

2.2.2 NANOWHISKAS

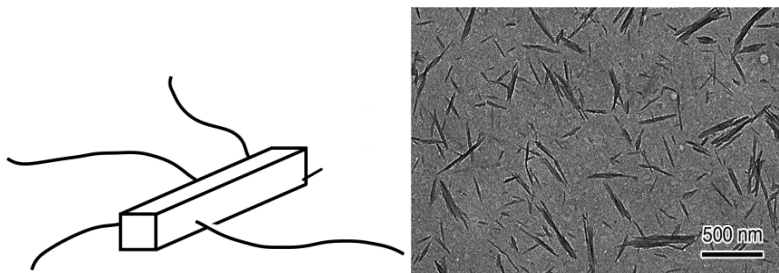


Figura 2.2 Nanowhiskas (Araki *et al.*, 2012)

Los polisacáridos están constituidos de una región cristalina y una amorfa, las regiones amorfas son altamente susceptibles a la hidrólisis y bajo condiciones controladas pueden ser removidas para obtener de la biomasa regiones cristalinas llamadas nanocristales polisacáridos con diferentes morfologías. Una de estas morfologías obtenidas son los whiskas (bigotes de gato) en tamaño nanométrico como se observa en la figura 2.2.

2.2.2.1 MÉTODOS DE OBTENCIÓN

Los nanowhiskas de quitina se pueden obtener por hidrólisis en soluciones de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) (Dufresne . *et al.*, 1999), hidrólisis ácida (Gopalan and Dufresne, 2003), oxidación mediada por TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo, radical libre) (Fan. *et al.*, 2007), ultrasonidos (Zhao. *et al.*, 2007), electrohilado (electrorrotación) (Min. *et al.*, 2004), tratamiento mecánico, gelación (Kadokawa. 2011) y sistema acuoso de NaOH/urea por congelado-descongelado (Fang. *et al.*, 2015).

2.2.2.2 PROPIEDADES

Los NWQ muestran muchas ventajas sobre las nanopartículas inorgánicas tradicionales como fácil disponibilidad debido a sus dimensiones nanométricas y por lo tanto gran área

superficial, baja densidad y fácil modificación conferida por los grupos hidroxilos superficiales.

2.2.3 NANOWHISKAS DE QUITINA

2.2.3.1 OBTENCIÓN DE NWQ

De acuerdo a que la mayoría de los métodos para elaborar nanowhiskas tienen alto costo, dificultad para disolverse y recuperarse, son volátiles y tóxicos, recientemente se ha investigado el uso de un disolvente verde que consiste en una solución acuosa de NaOH/Urea a partir de los cuales se ha propuesto un modelo estructural mostrado en la figura 2.3 a) (Fang. *et al.*, 2015). Así también a través de un proceso de congelación/descongelación, se hace notar que las conformaciones de la cadena del polímero y las interacciones intermoleculares entre éste y el solvente son importante en la regeneración y procesamiento de materiales con estructura y funciones específicas.

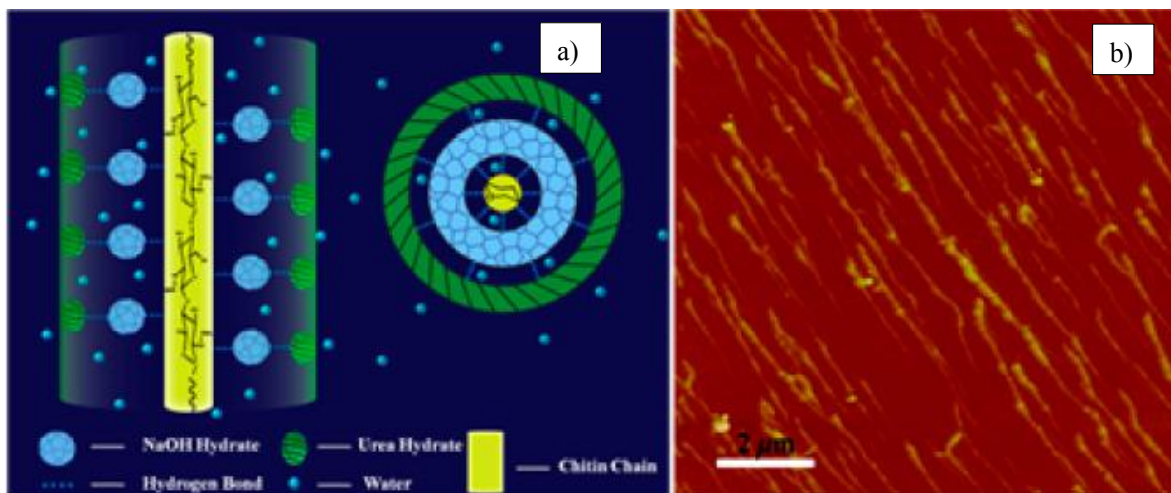


Figura 2.3 a) Descripción del modelo de cadena de quitina en solución acuosa Na/OH, b) Imagen AFM de quitina diluida en una solución de NaOH/urea. (Fang. *et al.*, 2015).

2.2.3.2 APLICACIONES

La investigación actual sobre las nanoestructuras de quitina como materiales funcionales como hidrogeles, aerogeles, películas, fibras y microesferas con estructura homogénea (Figura 2.4) y excelentes propiedades son ideales para aplicaciones en diferentes áreas por

ejemplo, en la industria de la fibra, debido a su uso como refuerzo (a través de la formación en red en base a enlaces de hidrógeno) de aditivos de materiales compuestos biodegradables (Uddin. *et al*, 2012), otra importante aplicación como material compuesto para uso biomédico es para la administración de fármacos (Lin. *et al*, 2011) y compuestos como vitaminas y carotenoides.

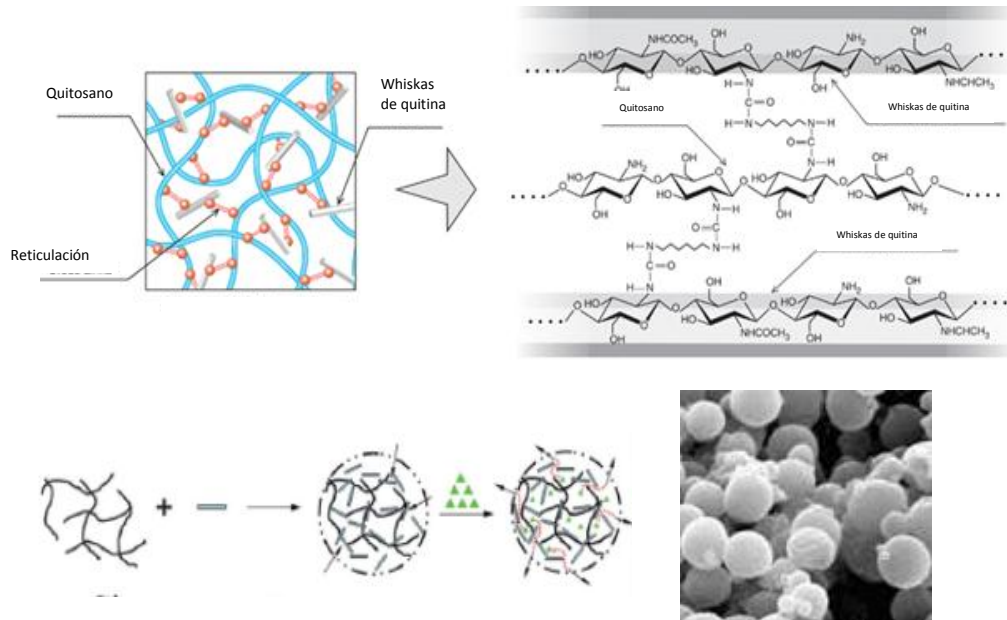


Figura 2.4 Aplicaciones de nanowhiskas como geles.

2.3 ASTAXANTINA

La astaxantina es un pigmento rojo que pertenece al grupo de los carotenoides. Los cuales son un grupo de moléculas extremadamente hidrofóbicas con poca o sin solubilidad en agua, estos a su vez comprenden más de 600 pigmentos que son sintetizados de novo en las plantas superiores, musgos, algas, bacterias y hongos (Goodwin, 1980). La estructura de los carotenoides y por lo tanto de la astaxantina deriva del licopeno. Los carotenoides se dividen en dos grupos: los carotenos que se componen de carbón e hidrógeno y las xantofilas que contienen además de carbón, hidrógeno y oxígeno.

2.3.1 ESTRUCTURA MOLECULAR

La astaxantina libre es una xantofila roja, su nombre se deriva del género del cangrejo *Astacuas astacus*, 3,3' dihidroxi- β,β caroteno-4,4'diona, la cual es una molécula que presenta 40 carbonos ($C_{40}H_{32}O_4$), con un arreglo de dobles enlaces conjugados o sistema polieno en el centro de la molécula y dos anillos terminales en los extremos de la cadena que contiene un grupo OH (hidroxilo) y un grupo C=O (cetona) en cada anillo (Figura 2.5). El sistema polieno da una característica molecular distintiva, propiedades químicas y características de absorción de luz cada doble enlace de la cadena puede existir en dos configuraciones, es por ello que en naturaleza, puede presentarse bajo cuatro configuraciones (isómero geométrico cis o trans) debido al arreglo asimétrico de los carbonos 3 y 3.9'; en el reino vegetal, frecuentemente se presentan los isómeros 3S y 3S' (Restrom *et al*, 1981). La mayoría de los carotenoides que se encuentran en la naturaleza son predominante todos los isómeros trans (Britton, 1995).

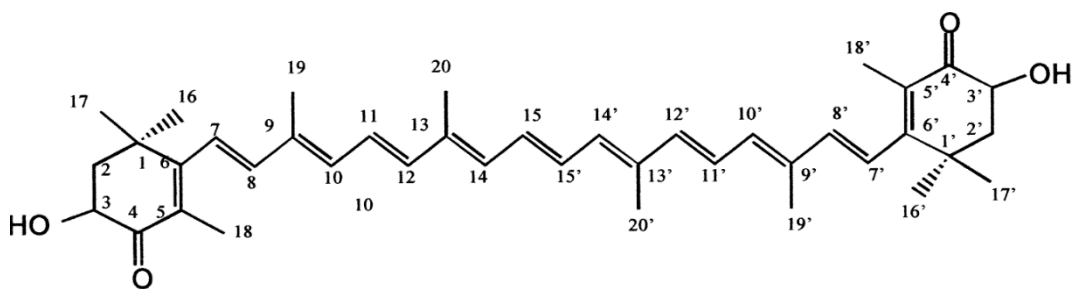


Figura 2.5 Estructura conformacional 3R.3'S de la astaxantina (Turujman *et al.*, 1997; Osterlie, 1999).

2.3.2 PROPIEDADES Y APLICACIONES

En experimentos previos se ha demostrado que la astaxantina es el antioxidante más potente conocido por la ciencia, en un experimento (Naguib, Y. M. A., 2000) compara la actividad antioxidante de varios carotenoides mostrando que la reactividad de astaxantina, luteína, licopeno, α -caroteno, β -caroteno y otros, es mayor encontrando que tiene mayor actividad antioxidante. En base a estudios realizados ha sido comprobado que la astaxantina presenta propiedades deseables como son: protege el ADN, estimula el sistema inmune, inhibir la peroxidación de lípidos protegiendo las membranas celulares y las mitocondrias del daño oxidativo, es un potente antiinflamatorio natural que bloquea las especies reactivas

del oxígeno, reduce los niveles de triglicéridos y de proteína C reactiva (PCR), aumenta el nivel llamado colesterol “bueno” o HDL y ayuda a estabilizar la concentración de azúcar en sangre (Miki, 1991).

2.3.3 DESVENTAJAS DE LA ASTAXANTINA

Como la mayoría de los carotenoides, la astaxantina es una molécula altamente insaturada y por lo tanto puede ser degradada fácilmente por procesos térmicos y oxidativos durante su manejo. También es sabido que condiciones de luz y alta temperatura pueden promover la isomerización a la forma *cis*, los isómeros *cis* de los carotenoides de la provitamina A tienen menor actividad que sus correspondientes carotenoides en configuración *all-trans* (Sweeney & Marsh, 1973). Es por ello que se ha trabajado en diversas investigaciones que centran la atención en la estabilidad de la astaxantina, algunas de estas investigaciones son: Elaboración de esferas poliméricas, emulsiones y β -ciclodextrina de acuerdo a diferentes autores (Higuera-Ciapara *et al.*, 2004, Tachaprutinun *et al.*, 2009, Ribeiro *et al.*, 2005, Chen., *et al* 2007).

2.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

En este apartado se presentan las diferentes técnicas de caracterización empleadas para identificar y conocer a través de ellas las características morfológicas, estructurales y térmicas de la quitina y del complejo QS-Ast

2.4.1 MICROSCOPIA ÓPTICA (MO)

El estudio detallado para conocer diferentes características morfológicas o estructurales en diversas investigaciones es posible debido al uso de instrumentos que nos permitan ampliar la imagen de las estructuras de los materiales. El nombre del microscopio óptico deriva etimológicamente de dos raíces griegas: *mikrós*, que significa pequeño y *skopéoo*, que significa observar. Es decir que el microscopio óptico es un instrumento que nos sirve para observar objetos o estructuras pequeñas. Esta técnica permite ver organismos y estructuras visibles a simple vista con una ampliación hasta cientos o miles de veces., a partir de ella podremos visualizar la morfología como son fibras, aglomerados, partículas entre otras con tamaños micrométricos a partir de las muestras obtenidas.

2.4.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

El microscopio electrónico de barrido es un microscopio electrónico, ya que emplea haces de electrones en lugar de ondas de luz para producir una imagen ampliada. Donde un campo magnético sustituye a las lentes y es posible ampliar un millón de veces más la imagen fotografiada (Olivas y Alarcón, 2004).

En el MEB el haz electrónico, atraviesa la columna y llega a la muestra, un generador de barrido es el responsable de producir el movimiento del haz de manera que barra la muestra punto a punto. A partir de la interacción entre los electrones incidentes con los átomos que componen la muestra se generan señales que son captadas por detectores específicos, el detector capta una señal y la convierte en una señal electrónica que es proyectada en una pantalla. La interacción haz incidente-muestra produce una variedad de señales, las cuales brindan distinta información sobre la superficie de la muestra.

2.4.3 MICROSCOPIA LASER CONFOCAL DE BARRIDO

La microscopia confocal es una técnica relativamente nueva que se ha desarrollado en los últimos años y que está logrando resultados en diversas ramas de la ciencia (medicina, biología, materiales, geología, etc.). Las ventajas sobre la microscopía óptica tradicional son debido a que se obtienen imágenes de mayor nitidez y contraste, mayor resolución vertical y horizontal, y sobre todo, la posibilidad de obtener secciones ópticas de la muestra, lo que permite su estudio tridimensional.

El principio de esta técnica se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera del foco. Para lo cual se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los planos inferiores y superiores (Boyde. 1988).

En la microscopía confocal se reconocen estructuras en las que la luz emitida o reflejada por la muestra es concentrada en un solo plano focal y se superpone a toda la luz que no procede de este plano. En un barrido puntual focal, las lentes del microscopio enfocan el haz de luz sobre un solo punto del objeto (punto focal). Después, el haz explora la

superficie del objeto punto por punto y genera una imagen barrida (el hecho de que el láser barre la muestra es denominado *Confocal Laser Scanning Mycroscopy*, CLSM).

Debido a que el láser aplicado a una longitud de onda determinada en la muestra hace que las moléculas excitadas de la misma emitan fluorescencia a una longitud de onda mayor a la aplicada. La fluorescencia puede darse de forma natural en determinadas sustancias (clorofila, tejidos frescos, etc.), denominada fluorescencia primaria o autofluorescencia. En otros casos para que la muestra tenga fluorescencia es preciso teñirla con un marcador fluorescente, denominado fluorocromo (fluorescencia secundaria). Cada fluorocromo amerita el uso de filtros específicos, dependiendo de la longitud de onda necesaria para su excitación. Es importante tener los filtros adecuados de emisión y las líneas laser de excitación para los fluoróforos.

2.4.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (FTIR)

Esta técnica espectroscópica emplea luz infrarroja es decir longitudes de onda entre 2.5 y 25 μm , al contacto con la materia genera vibración molecular. La cantidad de energía absorbida es proporcional a la fortaleza del enlace. En el proceso de absorción, las frecuencias de la radiación que coinciden con la frecuencia de vibración natural de la molécula son absorbidas, y la energía absorbida sirve para aumentar la amplitud de los movimientos vibratorios de los enlaces, solo aquellos que tienen un momento dipolar que cambia como una función del tiempo. Cada tipo de enlace tiene una vibración diferente, siendo posible determinar la información estructural de una molécula.

2.4.5 DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)

Esta técnica consiste en hacer interferir un haz de Rayos X a una agrupación ordenada de moléculas, es decir un cristal. Se describe como material cristalino aquel material sólido cuyos elementos constitutivos (átomos, iones, moléculas) se repiten de manera ordenada y paralela y cuya distribución en el espacio muestra ciertas relaciones de simetría. Por tanto, el cristal está formado por la repetición monótona de agrupaciones atómicas paralelas entre si y a distancias repetitivas específicas formando una red cristalina. En esta red existe una porción del espacio cristalino, denominado celda unitaria. Se utiliza el término “forma” para designar el aspecto externo de un cristal y forma como un grupo ideal de superficies

externas, planas y uniformes, “caras” (cristalinas todas), las cuales tienen la misma relación con los elementos de simetría y exhiben las posibilidades físicas y químicas. Así, las caras se agrupan según conjuntos equivalentes por simetría, los cuales se denominan formas cristalinas y se simbolizan por [hkl]. La denominación de estas caras cristalinas se realiza mediante los índices de Miller.

El fenómeno de la difracción puede describirse por la Ley de Bragg, que predice la dirección en la que se da interferencia constructiva entre haces de Rayos X

$$n\lambda = 2 d \sin \theta$$

Donde:

n es un número entero,

λ es la longitud de onda de los rayos X,

d es la distancia entre los planos de la red cristalina y,

θ es el ángulo entre los rayos incidentes y los planos de dispersión.

2.4.6 TAMAÑO DE PARTÍCULA

El instrumento comercial NanoSight LM20, es una técnica de análisis de seguimiento de nanopartículas, a través de la detección y visualización de las mismas utilizando una fuente de luz láser.

La fuente de luz láser ilumina a las nanopartículas en escala manométrica (15-600nm). Las cuales se observan sobre un fondo negro, en forma individual y dispersa en movimiento (movimiento browniano).

2.4.7 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA/DTG)

La TGA mide el peso y por lo tanto la masa de una muestra en función de la temperatura. Esta técnica permite detectar cambios en la masa de una muestra, ya sea ganancia o pérdida y evaluar los cambios en la masa como porcentaje de la masa inicial de la muestra. La curva típica TGA muestra las etapas de pérdida de la masa en relación con la pérdida de componentes volátiles (humedad, solventes, monómeros), descomposición del polímero y finalmente residuos (como cenizas)

A la primera derivada de la curva TGA con respecto al tiempo se conoce como curva DTG, es proporcional a la velocidad de descomposición de la muestra.

2.4.8 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido o DSC, es una técnica experimental que nos permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a una temperatura constante, durante un tiempo determinado o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante en un determinado intervalo de temperaturas. El objetivo de su uso es estudiar la influencia del tratamiento térmico sobre la microestructura y, en consecuencia, las propiedades de un material para determinar de esta forma el tratamiento más adecuado.

El equipo contiene dos cápsulas, una de ellas con la muestra a analizar y otra de ellas vacía (cápsula de referencia). Se usan calefactores individuales para cada cápsula y un sistema de control comprueba si se producen diferencias de temperatura entre la muestra y la referencia, si es así los calefactores individuales se corregirán de tal manera que la temperatura se mantendrá igual en las dos cápsulas. Es decir, cuando tiene lugar un proceso exotérmico o endotérmico, el instrumento compensa la energía necesaria para mantener la misma temperatura en ambas cápsulas.

En general se puede decir que todas las transformaciones o reacciones donde se produce un cambio de energía. Puede medirse por DSC. Entre las utilidades de DSC podemos destacar:

- Medidas de capacidad calorífica aparente.
- Determinación de temperaturas características de transformación o transición, como: Transición vítrea (T_g), cristalización, transformaciones polimórficas, fusión, ebullición, sublimación, descomposición, etc.
- Estabilidad térmica de los materiales
- Cinética de cristalización
- Estabilidad oxidativa

2.4.9 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La astaxantina es una xantofila, de la familia de los carotenoides, en específico al grupo de carotenoides que contienen oxígeno. La importancia de la astaxantina no solo está

relacionada con su capacidad colorante, sino también por su poder antioxidante que ha mostrado ser mejor que el β -caroteno y la luteína. Ello debido a sus características químicas estructurales, como son la presencia de oxígeno en forma de grupos hidroxilos (OH) y carbonilos (C=O) (Córdoba. *et al*, 2015), además de conferirle otras propiedades (capacidad de esterificación y naturaleza polar) (Seabra y Pedrosa. 2010). No dejando a un lado los beneficios por su alta capacidad antioxidante que se reflejan en la prevención de enfermedades relacionadas con el daño oxidativo (Xuebo y Toshihiko. 2007).

Para realizar la evaluación de la actividad antioxidante se recurre a diferentes métodos, siendo uno de ellos el método DPPH, el cual determina actividades de captura de radicales libres, en presencia de una sustancia antioxidante, midiendo el potencial de inactivación de dicho radical en medio acuoso (Hseu. *et al.*, 2008).

2.4.9.1 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN

El método DPPH es utilizado desde hace tiempo por diferentes autores quienes han realizado adaptaciones del mismo, como cambios en la concentración DPPH, tiempo de incubación, relación DPPH/muestra, etc. (Delgado *et al.*, 2005, Dupas *et al.*, 2006). El método del DPPH está basado en medir la captación del radical libre DPPH por parte de una estructura antioxidante. Este radical estable presenta una disolución en color violeta oscuro. Una vez mezclado radical y sustancia antioxidante, a mayor captación de radical libre por parte del antioxidante, habrá una mayor disminución de la absorbancia inicial del radical DPPH, lo que conlleva a una decoloración del color violeta inicial. Esta diferencia de absorbancia nos indicará la capacidad antioxidante del extracto en estudio.

CAPITULO 3. METODOLOGÍA

3.1 REACTIVOS Y SOLVENTES

Astaxantina. (Sigma-Aldrich-41659) (Fórmula $C_{40}H_{52}O_4$). Sinónimo: (3S, 3'S)-3,3'-Dihidroxi- β , β -caroteno-4,4'-diona. Peso molecular 596.84 g/mol. Polvo color violeta. Punto/intervalo de fusión 220-225°C. Solubilidad en agua 0.083 g/l. Soluble en los disolventes: cloroformo (6 g/l) y dimetilformamida (0.5 g/l). Almacenar a -20°C.

Quitina. (Sigma Aldrich-C7170) (Fórmula $(C_8H_{13}NO_5)_n$). Chitin obtenido de cascara de camarón. Sinónimo Poly(N-acetyl-1,4- β -D-glucopyranosamine). No soluble en agua. Soluble en DMAc/LiCl, CaCl-2H₂O saturado, ácido fosfórico a temperatura ambiente. Se almacena en un lugar seco y protegido de rayos UV a temperatura ambiente.

Hidróxido de sodio. (Fórmula NaOH). Peso molecular 40 g/mol. Forma gránulos. Color blanco. Olor inodoro. Punto de fusión 318°C. Punto inicial de ebullición 1390 °C. Densidad aparente 1150 kg/m³. Almacenamiento conserve el envase herméticamente cerrado en un lugar seco y bien ventilado.

Urea. También denominada carbamida, se presenta en forma de pequeños cristales blanquecinos, altamente higroscópicos, con cierto olor amoniacal. Insoluble en disolventes orgánicos (cloroformo y éter). Punto de fusión 132-134°C.

Calcoflúor White M2R. (Fórmula $C_{40}H_{44}N_{12}O_{10}S_2$) Sinónimo Fluorescent brightener 28. Peso molecular 916.98176 g/mol.

Metanol. (Fórmula CH_3OH). Grado anhidro. Incoloro, líquido. Temperatura de autoignición (autoinflamación) 725°F.

DPPH. (Nombre: 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil) (Fórmula $C_{18}H_{12}N_5O_6$). Sinónimos 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical y 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl. Temperatura de almacenaje recomendado 2-8°C. Aspecto polvo. Punto de fusión 135°C.

3.2 FORMACIÓN DE NANOWHISKAS DE QUITINA (NWQ)

La formación de nanowhiskas de quitina se inició preparando una solución en frío de quitina y solvente (QS) basado en el método (Tang., 2014) modificado, para la cual se usaron 0.5g de quitina, así como 9.5 g de la siguiente mezcla: 12% en peso de NaOH, 4% en peso de urea y 84% en peso de agua, y se agitó (600 rpm, 17 h) a temperatura ambiente.

Una vez preparada QS se almacenó en refrigeración a -20°C por 8 horas, enseguida se descongeló, a esto se le denomina criotratamiento. Se realizaron 6 criotratamientos, al finalizar cada uno se agitó (15 min, 600 rpm, T_{amb}), hasta la obtención de un sólido transparente (QS_{ST}). Este QS_{ST} fue sometido a dos procesos independientes y simultáneos.

1). De QS_{ST} se toma 1g (alícuota), a la cual se le agregaron 30 ml de agua destilada, se sometió a agitación mecánica a 300 rpm por 72 horas. De esta manera se obtienen Nanowhiskas de Quitina obtenidos por agitación mecánica, etiquetada como NWQ_{AMEC} .

2). De QS_{ST} se toma 1g (alícuota), a la cual se le agregaron 30 ml de agua destilada, se sometió a ultrasonido en un Sonificador Branson 2510 (frecuencia 40 kHz), realizando 5 ciclos de 60 minutos. De esta manera se obtienen Nanowhiskas de Quitina obtenidos por ultrasonido, etiquetada como NWQ_{US} .

Las muestras de QS NWQ_{AMEC} y NWQ_{US} se secaron en baño de aceite manteniendo la temperatura entre $35\text{-}40^{\circ}\text{C}$ hasta evaporación y finalmente se realizó un segundo secado en la estufa a presión constante de 22.6 in Hg, temperatura de 27°C y vacío.

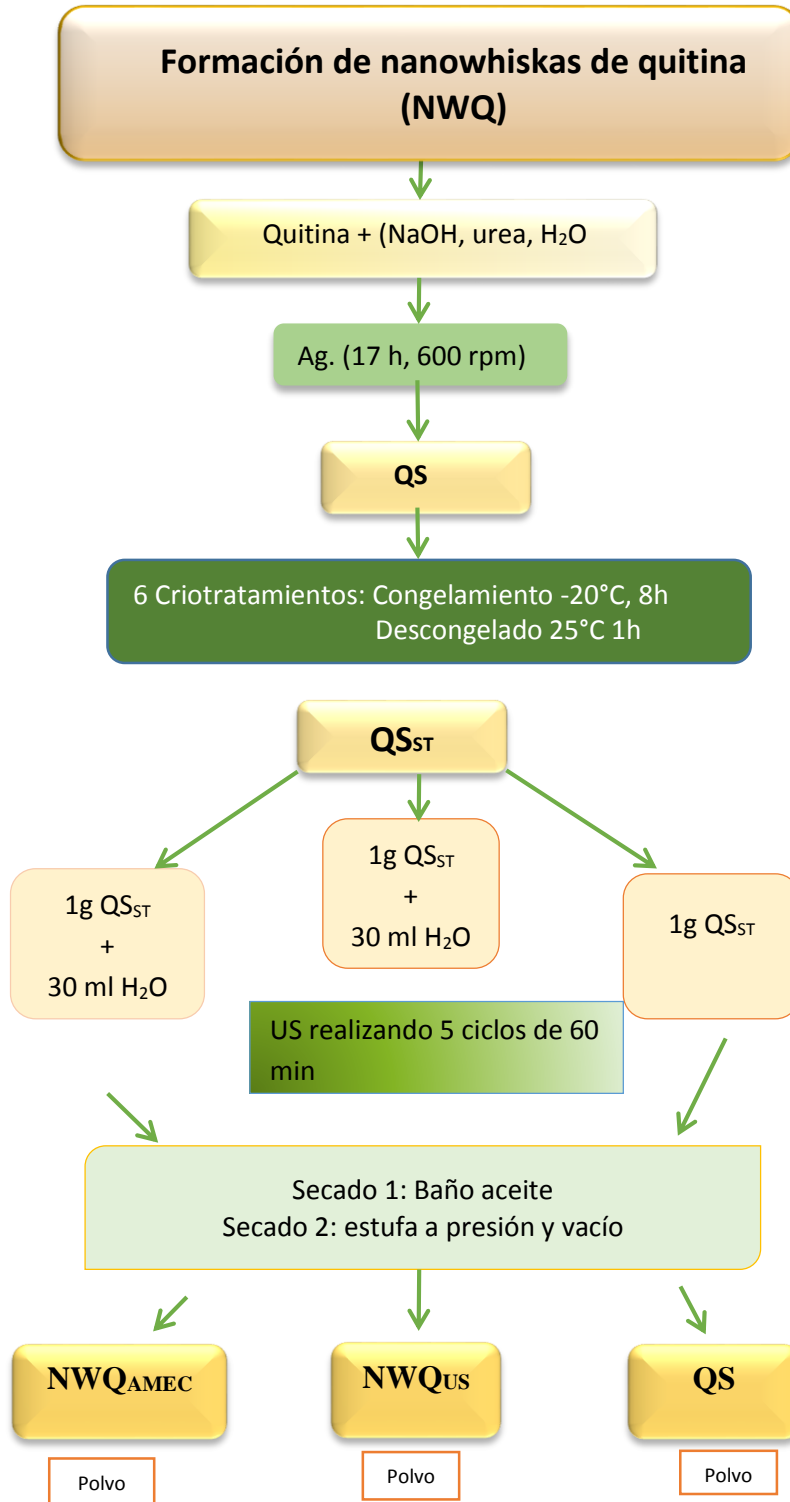


Figura 3.1 Diagrama de obtención de nanowhiskas de quitina (NWQ)

3.2.1 MODELO PROPUESTO ENTRE LA QUITINA Y EL SOLVENTE (NaOH-Urea-sistema acuoso)

En la figura 3.2 a) se presenta el modelo propuesto por Yan. *et al.*, (2015), que surge a partir de las interacciones entre la cadena de quitina en solución acuosa con el NaOH y la urea, a través del proceso de autoensamblaje se obtuvo la agregación de las cadenas de quitina desde el sistema acuoso NaOH/ urea. b) Se representan las interacciones intermoleculares partiendo del mismo modelo, entre la quitina en solución acuosa con el NaOH / urea. Donde las cadenas de quitina quedan en la parte central rodeadas a su vez de NaOH y en la parte externa la urea.

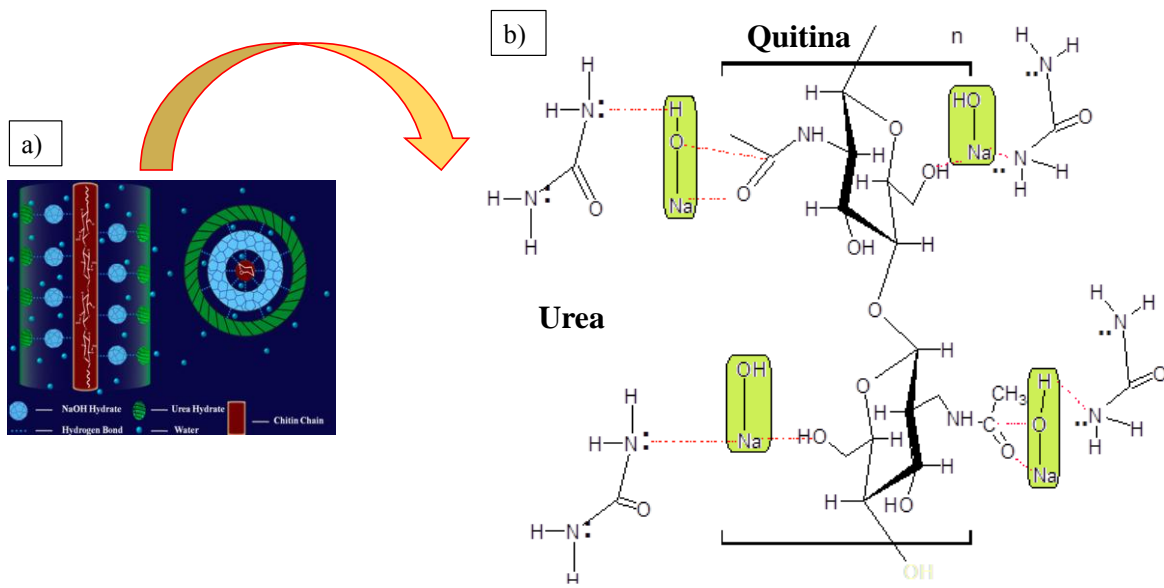


Figura 3.2 Modelo propuesto de la disolución quitina. a) Estructura de vaina (Yan. *et al.*, 2015) y b) Posibles interacciones del quitina-solvente en solución acuosa.

3.3 INCORPORACIÓN IN SITU DE ASTAXANTINA EN LOS NWQ

En la segunda etapa se incorporó astaxantina (Ast) a los NWQ. En el momento de la astaxantina se le protegió de la luz y se incorporó en atmósfera de N_2 a la QS_{Sol} .

Se disolvió quitina (QS) en una mezcla de: 12% en peso de NaOH, 4% en peso de urea y 84% en peso de agua, se agitó (600 rpm, 17 h, T_{amb}). Se tomaron dos muestras por separado

de 30 ml de QS, a cada una se agregó astaxantina a dos concentraciones ($C1= 3.35 \times 10^{-7}$ mol y $C2=2.765 \times 10^{-7}$ mol) y agitó (15 min, 600 rpm).

Las muestras se sometieron a 6 tratamientos (iguales condiciones de etapa 3.2), agitando al término de cada criotratamiento (600 rpm, 17 h, T_{amb}). Posteriormente esta muestra fue sometida a dos procesos independientes y simultáneos:

a) Una de las muestras se somete a agitación mecánica (AMEC) a 300 rpm, por 72 h. De esta manera se obtienen Nanowhiskas de Quitina conteniendo ast obtenidos por agitación mecánica, etiquetada como NWQ-Ast_{AMEC-C1} y NWQ-Ast_{AMEC-C2}.

b) Otra de las muestras se somete por ultrasonido (US) en 5 ciclos, 60 min, 40kHz. De esta manera se obtienen Nanowhiskas de Quitina conteniendo ast obtenidos por ultrasonido etiquetado como NWQ-Ast_{US-C1} y NWQ-Ast_{US-C2}.

Las cuatro muestras anteriores se secan, en baño de aceite (35-40°C), hasta evaporación del solvente, seguido de un secado en estufa de vacío (22.6 in Hg, 27°C). Así, se obtienen las muestras en polvo para los análisis posteriores.

3.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

3.4.1 MICROSCOPIA ÓPTICA (MO)

La caracterización por MO para observar la morfología de las muestras se llevó a cabo mediante un microscopio marca Leica DRM-XA con contraste de fase a 40X. El poder de resolución es de 200nm-0.4µm. Las muestras se colocaron en portaobjetos.



Figura 3.3 Microscopio óptico marca Leica DRM-XA

3.4.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Para realizar el análisis morfológico se utilizó un microscopio de emisión de campo JEOL JSM-7600 de la superficie de los nanowhiskas como tratamiento previo, secado de muestras y recubrimiento con película de carbón sobre portamuestras.

3.4.3 MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL DE BARRIDO

Para obtener las imágenes se utilizó un Microscopio Laser Confocal de Barrido FV1000 marca Olympus. Las muestras a analizar se colocaron sobre un portaobjetos, agregando una gota de calcoflúor (0.05g/100ml) y una gota de KOH al 10%, finalmente un cubreobjetos, para la quitina se utilizó el colorante blanco de calcoflúor, debido a la afinidad que presenta por la quitina presente en la pared celular de los organismos fúngicos (Gip y Abelin, 1986) y en la propiedad que tiene dicha sustancia de emitir fluorescencia al ser activada por la radiación UV. La astaxantina no requirió un fluorocromo, ya que es un compuesto orgánico autofluorescente.

Para representar a la quitina se eligió el canal DAPI (longitud de onda excitación 405 y longitud de onda de emisión 461nm) y el canal de fluorescencia para representar la astaxantina Cy5.5 (longitud de onda de excitación 635nm y emisión 693nm).



Figura 3.4 Microscopio Confocal Laser de Barrido

3.4.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (FTIR)

El registro de los espectros IR se realizaron en un equipo FTIR TENSOR 27 BRUKER, rango de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .

3.4.5 DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)

Los estudios DRX se obtuvieron a través de un difractómetro de rayos X Bruker D8 Advance con radiación de Cu a una longitud de onda de 1.54060.

3.4.6 TAMAÑO DE PARTÍCULA

Se realizó la medición del Tamaño de Partícula en el equipo NanoSight Nanoparticle Analysis System LM20.



Figura 3.5 Reporte PDF de equipo NanoSight

3.4.7 ANÁLISIS TÉRMICO (TGA&DSC)

El análisis térmico se llevó a cabo en un equipo de análisis térmico simultaneo de NETZSCH STA 449 F3 Jupiter® el cual permite la medida de cambios de masa y efectos térmicos. Las muestras en polvo se colocaron en crisoles de aluminio (1.4-1.6 mg). La muestra se calentaron una velocidad de 40°K/min en atmósfera de nitrógeno dinámica, desde 27°C hasta 450°C.



Figura 3.6 Equipo NETZSCH STA 449 F3 Jupiter

3.4.8 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH (% DE INHIBICIÓN)

Para la obtención de extracto: a) Se pesó 0.02 g de muestra, agregando 0.8 ml de metanol/agua (5:5) acidificado con HCl a pH=2. b) Se agitó en un vortex durante 1 min. c) Se agitó nuevamente a 220 rpm, y se incubó 1 hr a 25°C, se recuperó la muestra y se cubrió con aluminio. d) Se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante. Al sólido se adicionó agregar 0.8 ml acetona/agua (7:3) y repitió el proceso de b) y c). e) Los extractos son recuperados.

El método DPPH se basa en medir la captación del radical libre DPPH por parte de una estructura antioxidante. Para iniciar se pesaron 0.00394 g de DPPH en un matraz y se aforo a 100 ml con metanol al 80%. Para hacer las lecturas se utilizó un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 20 para lo cual se prepararon las muestras de la siguiente manera en un tubo falcón forrado de aluminio se depositaron 3.8 ml de solución de DPPH y 200 µl del extracto de la muestra y se agitó vigorosamente, depositar sobre la celda para realizar la lectura en el espectrofotómetro a los 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 30 y 60 min, las lecturas se realizaron por triplicado Los resultados se obtuvieron como % de inhibición utilizando la fórmula (Burboa *et al.*, 2014) siguiente:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Absorbancia inicial} - \text{Absorbancia final}}{\text{Absorbancia inicial}} \times 100$$



Figura 3.7 Espectrofotómetro UV

CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 MICROSCOPIA ÓPTICA (MO)

En la Figura 4.1 se observan las micrografías por MO: a) QS son microhojuelas de formas regulares, color blanco y textura brillante, b) los NWQ_{US} son aglomerados de partículas con una superficie suave de color amarillo claro y c) los NWQ_{AMEC} las cuales muestran una superficie de aspecto fibroso y color amarillo.

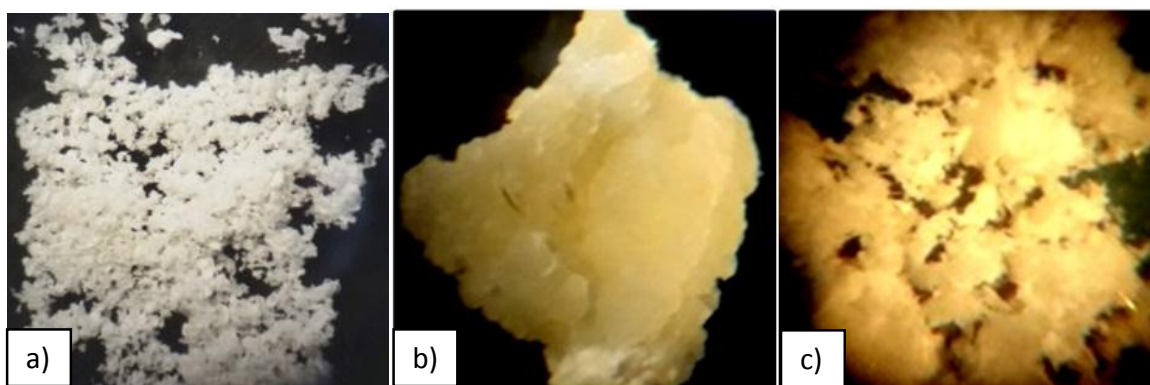


Figura 4.1. Micrografía por MO: a) QS b)NWQ_{US} y c)NQW_{AMEC}

4.2 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (MEB)

La Figura 4.2a) 2000X y 4.2b) 10000X se observa la quitina (QS) formando una película con aspecto amorfo y rugoso, lo cual indica que las cadenas quitina están en desorden o sin alineación.

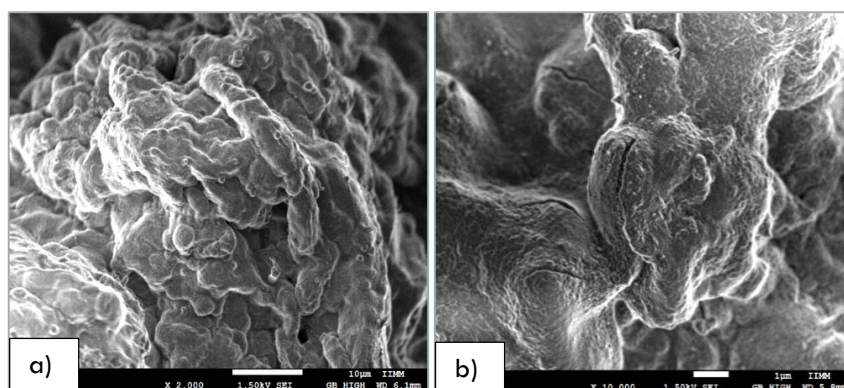


Figura 4.2. Micrografía por MEB de QS a) 2000X y b) 10000X

En la figura 4.3 se muestran el análisis por MEB llevado en dos áreas de los NWQ_{AMEC}. En la primera área, inciso a) 2000X, se observan manojos de fibras que parten del centro hacia

afuera, los cuales son sitios de concentración de esfuerzos. En la segunda área, en el inciso b) 10000X se aprecian estructuras planas, alargadas y delgadas con terminación en puntas, las cuales como estructuras de quitina cristalina. Estas estructuras uniformemente espaciadas y orientadas mostraron tamaños en diámetro en un rango de 20-40 nm.

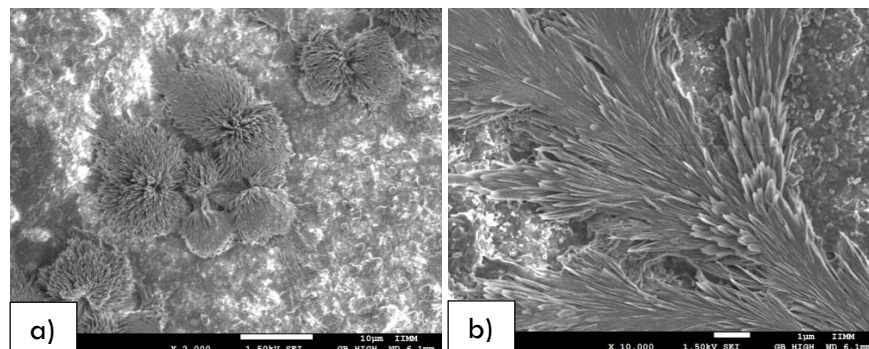


Figura 4.3. Micrografía por MEB de NQW_{AMEC} : a) 2000x y b) 10000x

En la figura 4.4 se muestran el análisis por MEB, de los $NWQ-Ast_{AMEC-C1}$ ($C1=3.35 \times 10^{-7}$ mol) obtenida a 10,000X, 20,000X y 50,000X. Es visible una superficie rugosa, con aspecto suave. No se observan los ramilletes de nanowhiskas de quitina lo que sugiere que la incorporación de la astaxantina a altas concentraciones, promueve la disociación de los arreglos cristalinos (NWQ). De tal manera, que existe una dispersión de los NWQ por la oclusión de la ast.

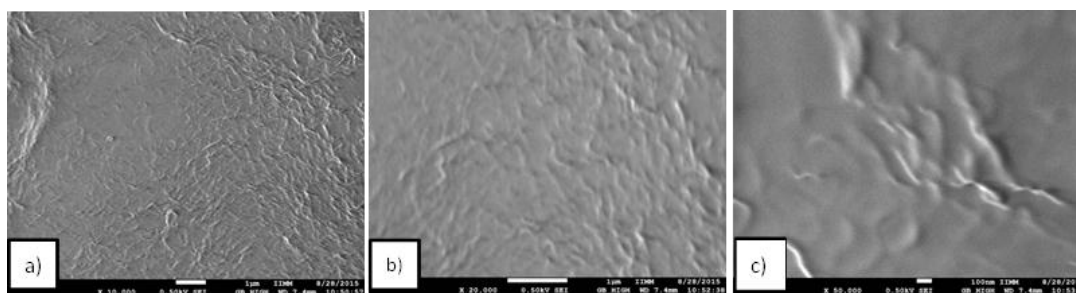


Figura 4.4. Micrografía por MEB de $NWQ-Ast_{AMEC-C1}$: a) 10000X, b) 20000X y c) 50000X.

En la figura 4.5, se muestran los $NWQ-Ast_{AMEC-C2}$ y ($C2=2.765 \times 10^{-7}$ mol) a diferentes aumentos. En esta concentración más baja de ast, se conservan las formas originales de los NWQ distribuidos sobre la superficie de forma disgregada. Así mismo, los NWQ presentan terminaciones en punta. En una amplificación a la imagen b) y c) se exhibe la afinidad que existe entre la astaxantina y la quitina debido a que los NWQ son impregnados por la

astaxantina. De tal forma, que los cristales de NWQ cambian de una superficie afilada (recta) a una con un alto nivel de rugosidad.

Las muestras de NWQ-Ast analizadas por EDS (Figura 4.5d) se confirma la presencia de los NWQ y ast por detección de C, N y O. Adicionalmente, se justifica la existencia del modelo propuesto para los NWQ con la detección del Na^+ , el cual es un elemento contenedor de la estructura cristalina de la quitina.

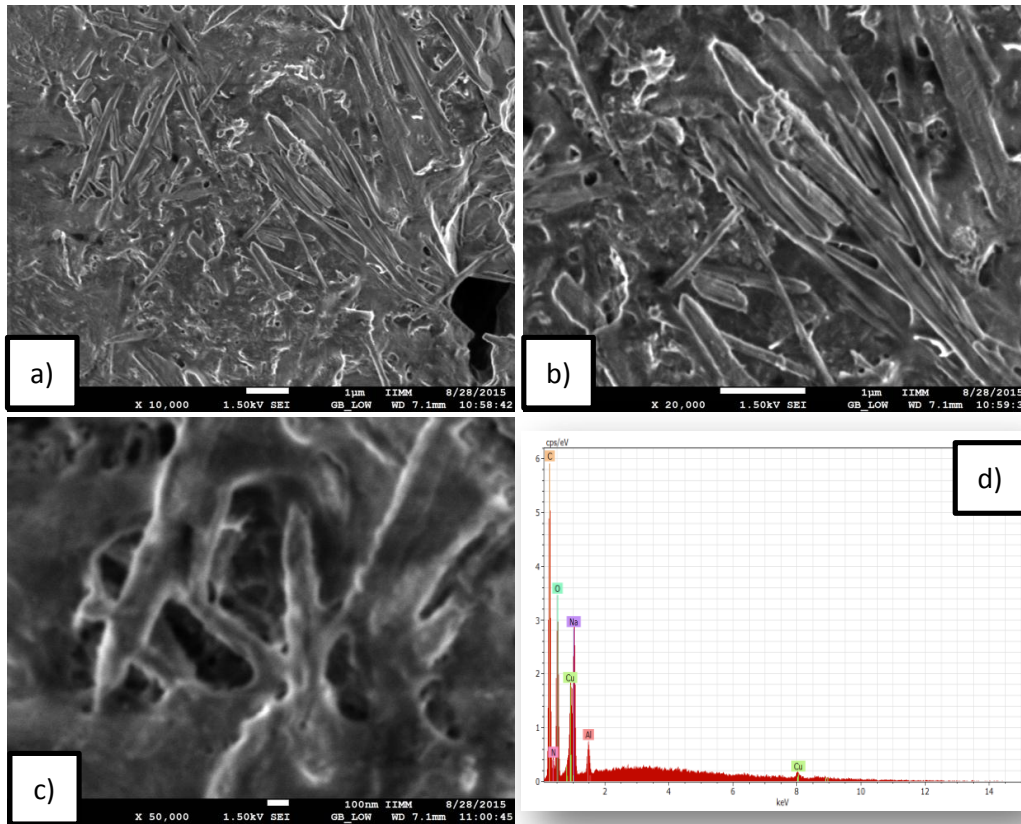


Figura 4.5. Micrografía por MEB de NQW-Ast_{AMEC-C2}: a) 10000X, b) 20000X, c) 50000X y d) Análisis EDS

A partir de la comparación anterior entre NQW-Ast_{AMEC-C1} y NQW-Ast_{AMEC-C2}, se advierte que a bajas concentraciones de la ast (C2), es posible mantener la cristalinidad de las muestras de NQW_{AMEC}.

Las micrografías obtenidas por MEB de los NWQ_{US} muestran en la figura 4.6 a) 500X, estructuras con largas, planas y con terminaciones en puntas, con diámetros a partir de 10-20 μm . Finalmente, en el inciso b) 500X, se observaron fibras en pequeños grupos unidos, esferulitas con varias terminaciones en la periferia.

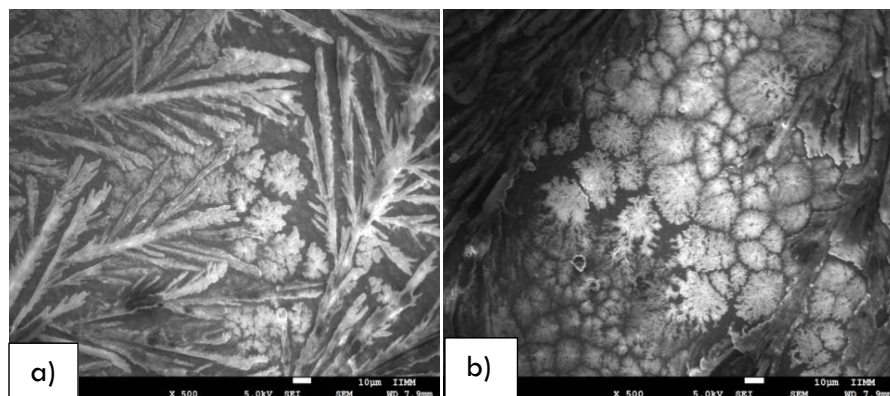


Figura 4.6. Micrografía por MEB de NWQ_{US} : a) 500X y b) 500X.

Comparando los NWQ_{AMEC} y NWQ_{US} se puede observar que NWQ con ultrasonido proveen mayor área superficial, originando más sitios para funcionalizar, lo cual es deseable para la formación de enlaces moleculares.

En la figura 4.7, se muestran los $NWQ-Ast_{US-C1}$ ($C1= 3.35 \times 10^{-7}$ mol) a diferentes aumentos. Se observa una más alta integración de la ast a los NWQ_{US} que a los NWQ_{AMEC} . Esta mayor compatibilidad es debido al menor tamaño del NWQ_{US} . Las fibras de quitina y ast coalesce en la superficie rugosa, modificando los arreglos de los NWQ_{US} . A mayores aumentos (50,000X) se observan arreglos amorfos. La tendencia de la ast a formación de estructuras amorfas representa un efecto negativo por la disminución de propiedades mecánicas, ya que con esto se elimina la parte cristalina, la cual refuerza las propiedades mecánicas.

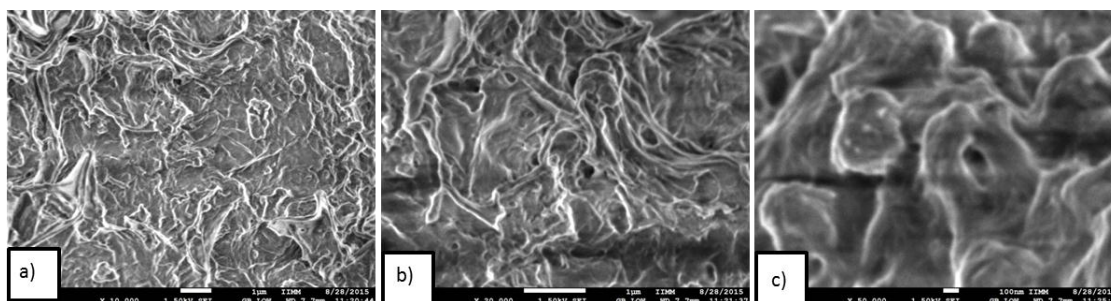


Figura 4.7. Micrografías por MEB de NWQ_{US-C1} : a) 10,000X, b) 20,000X y c) 50,000X.

En la figura 4.8, se muestran los $NWQ-Ast_{US-C2}$ ($C2=2.765 \times 10^{-7}$ mol) a dos magnificaciones 10,000X y 20000X. En la primera, se presenta la disociación del arreglo inicial compacto de “tipo esferulitas” de los NWQ_{US} , a una disgregación desordenada de las nanofibras. Esta disgregación de los NWQ_{US} es atribuida a la energía aportada por el

ultrasonido y también a la disminución de las interacciones por puente de hidrogeno intramoleculares de la quitina debido a la incorporación de la astaxantina.

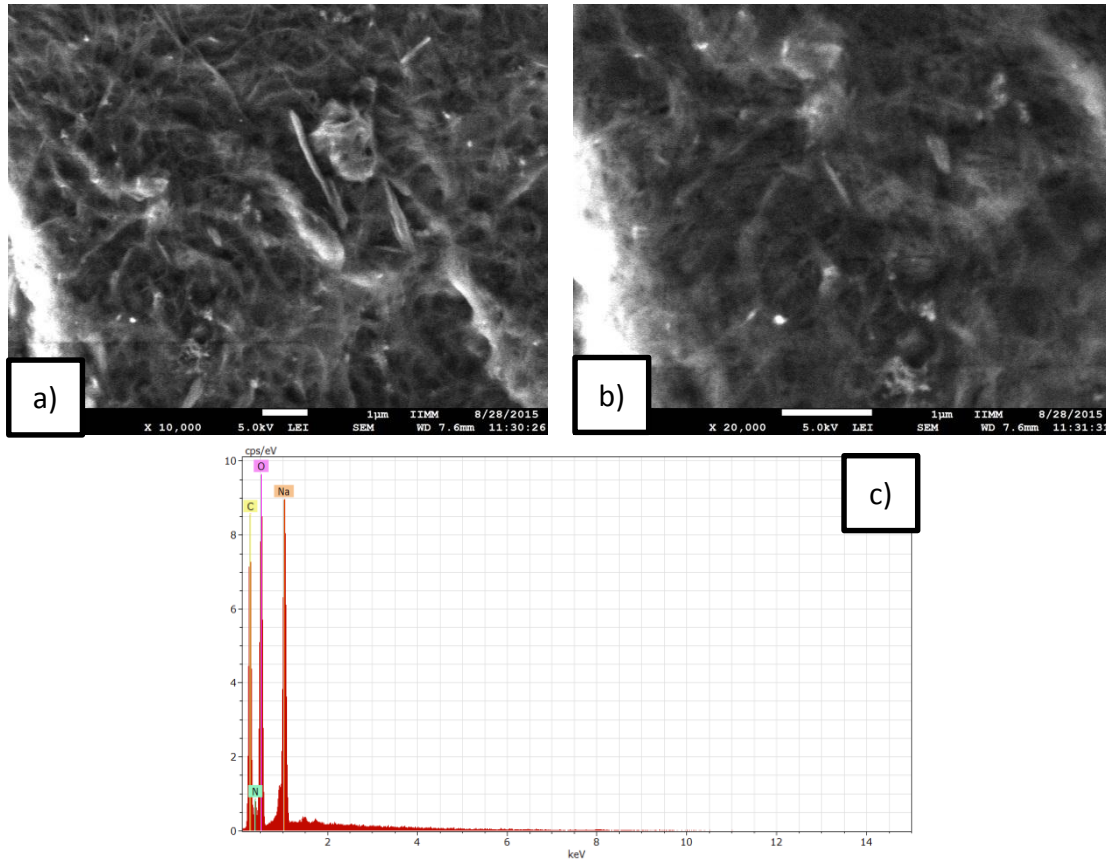


Figura 4.8. Micrografías por MEB de NQW_{US-C2}: a) 10000X, b) 20000X y c) Análisis EDS.

Por comparación entre NQW-Ast_{US-C1} y NQW-Ast_{US-C2}, se establece que a altas y bajas concentraciones de ast, no es posible mantener la cristalinidad de las muestras de NQW_{US}.

4.3 MICROSCOPIA LASER CONFOCAL DE BARRIDO

Imágenes adquiridas en el Microscopio laser confocal de barrido (CLSM) en un equipo Olympus Flouview FV1000 con el objetivo de 4X, utilizando las siguientes líneas laser: DAPI (para el marcaje de la quitina, en azul) y Cy5.5 (para visualizar la astaxantina y los pigmentos, en rojo).

Los resultados muestran en la figura 4.9, que la quitina presenta una tinción de color azul como resultado de una interacción positiva de la quitina con el pigmento azul (blanco de calcoflúor), mientras que el espacio entre las capas y fibras no muestran tinción

significativa. De igual forma la astaxantina se observa en rojo la cual no requirió ser teñida mostrando una interacción positiva.

En la figura 4.9c) se observa la quitina solvatada, en donde se aprecian tonalidades rosas y lilas, lo cual sugiere que la quitina posee restos de algún pigmento de origen, además de considerar que en estado solvatado presenta urea e NaOH.

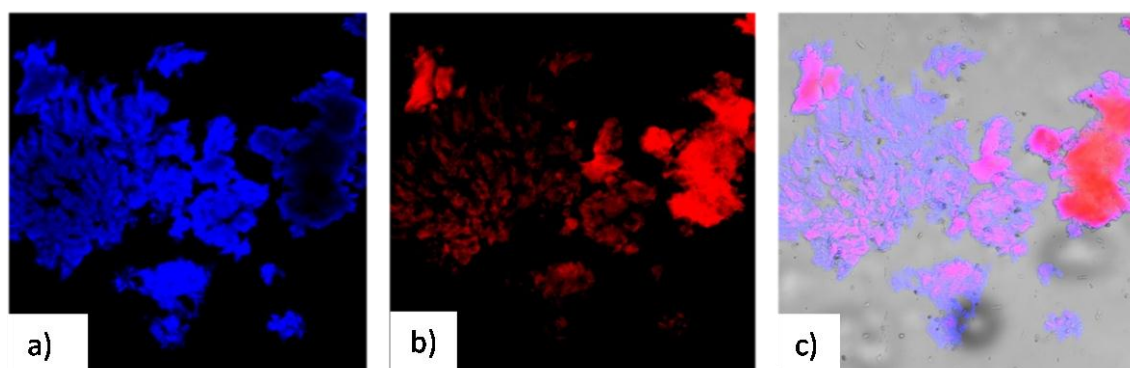


Figura 4.9. Imágenes por Microscopía Confocal de QS a 9.6X: a) Quitina, azul; b) Astaxantina, rojo y c) Interface, rosa

En la Figura 4.10 se observa los NWQ- Ast_{AMEC-C1}, obtenidos por agitación mecánica con una mayor concentración de ast, en el inciso c), se observa la interface entre los dos componentes, se observan las fibras de quitina con tinción purpura y la presencia de agregados de astaxantina en la matriz (rosa intenso).

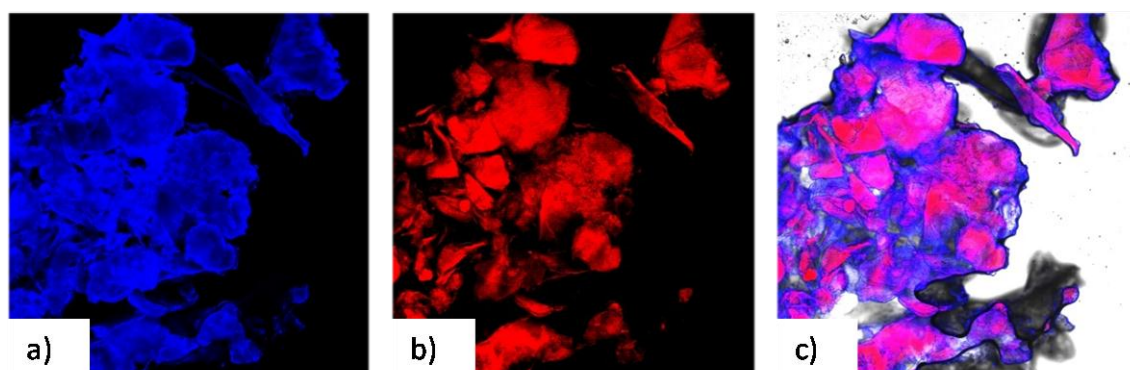


Figura 4.10. Imágenes por Microscopía Confocal de NWQ-Ast_{AMEC-C1} a 9.6x: a) Quitina, azul; b) Astaxantina, rojo y c) Interface de ambos componentes, rosa

La tinción de los NWQ-Ast_{AMEC-C2} (Figura 4.11) ilustra no sólo capas teñidas con azul de quitina y en rojo de ast, también de zonas de color en entre las capas, lo que indica un relleno de la matriz con ast. Se observa una mejor dispersión de la ast en los NWQ.

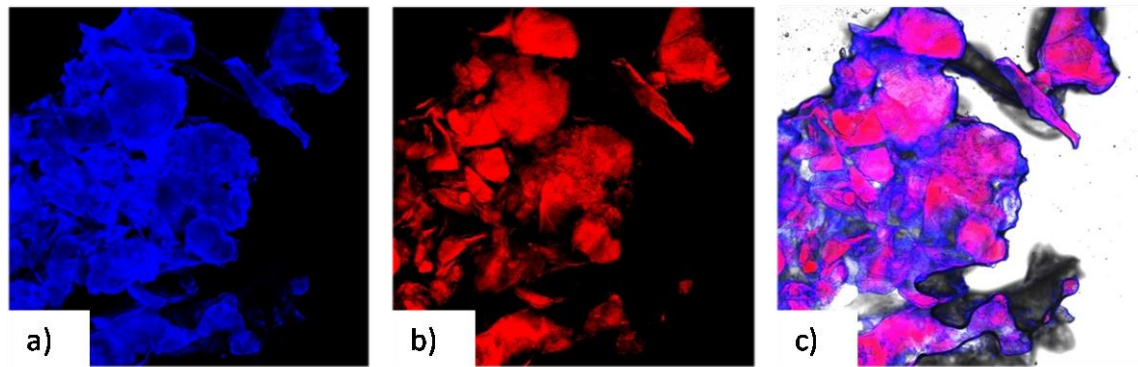


Figura 4.11. Imágenes por Microscopía Confocal de NWQ-Ast_{AMEC-C2} a 9.6X: a) Quitina, azul; b) Astaxantina, rojo y c) Interface de ambos componentes, rosa

La micrografía de la Figura 4.12, corresponde a los NWQ-Ast_{US-C1} con mayor cantidad de astaxantina obtenidos por ultrasonido. En ellas se observa más claramente la distribución de las fibras y predomina la tinción en azul. Se observa ligera tinción en rosa intenso entre las fibras y agregados de ast. Se puede indicar que a mayores concentraciones de astaxantina, son menores los sitios de interacción con los NWQ

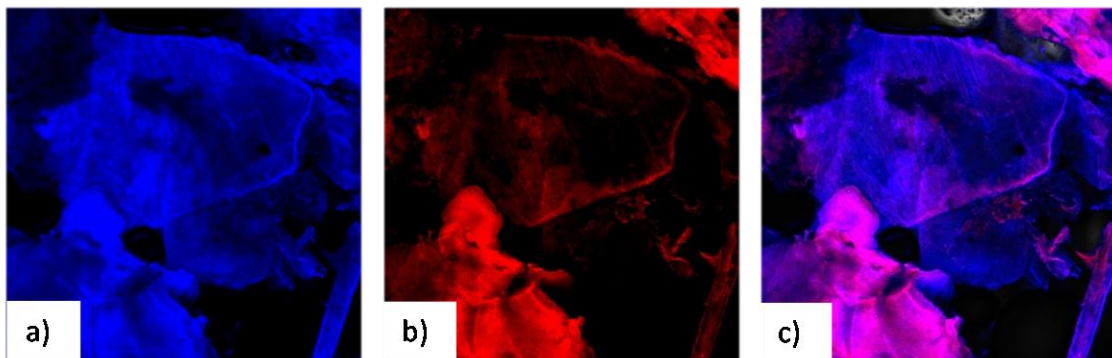


Figura 4.12. Imágenes por Microscopía Confocal de NWQ-Ast_{US-C1} a 9.6x: a) Quitina, azul; b) Astaxantina, rojo, c) Interfaz de ambos componentes, rosa.

Lo anterior se corrobora en la Figura 4.13c) en donde, los NWQ con menor concentración de ast presentan más sitios de interface de los dos componentes y con una mayor dispersión en la matriz de NWQ. Por lo tanto estos estudios muestran que los NWQ independiente obtenidos con menor concentración de astaxantina, presentan una mejor distribución de astaxantina con mayores sitios de interface, independientemente del método de obtención de los NWQ.

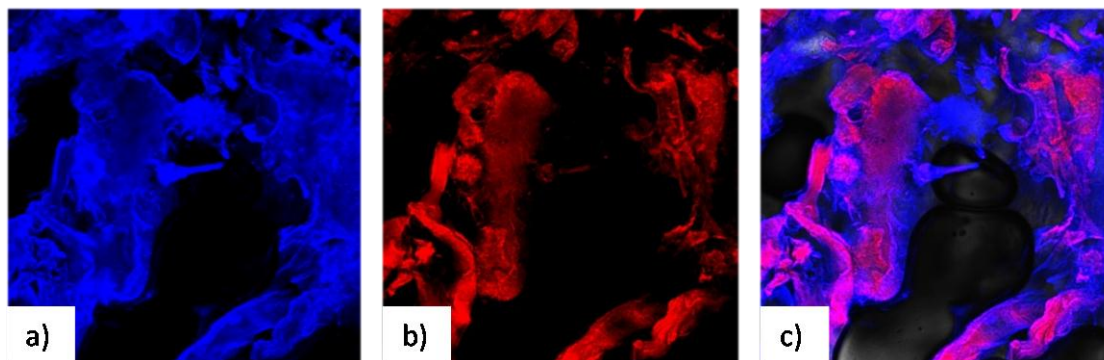


Figura 4.13. Imágenes por Microscopía confocal de NWQ-Ast_{US-C2} a 9.6x: a) Quitina, azul; b) Astaxantina, rojo, c) Interface de ambos componentes, rosa

4.4 ESPECTROSCOPIA INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

En la Figura 4.14 se señalan los principales grupos funcionales de la QS. La región entre los 600 y 1700 cm^{-1} es la “huella digital” en la quitina pura, entre 3542 y 3084 cm^{-1} se observa una banda ancha de baja intensidad asociada a los OH y N-H, en 2962 cm^{-1} se presentan los grupos C-H con vibración simétrica. Aparecen las bandas de los grupos C-O a 1675 cm^{-1} , amida primaria y secundaria a los 1756 y 1769 cm^{-1} , amidas secundarias en fase sólida presentan bandas intensas características a $1570\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$. La quitina tiene un desplazamiento y disminución de la intensidad de las señales, lo cual puede estar asociado a los impedimentos de los grupos funcionales originados por los grupos polares presentes y por la presencia de interacciones entre los grupos NH –OH ó NH—NH. En la región cerca de los 1683 cm^{-1} vibraciones de estiramiento del grupo C=O (carbonilo) asociado a grupos amida pueden observarse. La señal intensa en los 1431 cm^{-1} corresponde a los grupos –C-H los cuales en la estructura de la quitina pura pueden estar asociados con grupos OH que vibran en los 1404 cm^{-1} o con el grupo acetilo de la misma estructura. La señal teórica para la quitina en fase sólida, asociada al enlace C-O-C se encuentra a 1156 cm^{-1} , para el caso del gel se observa una banda muy débil y desplazada a 1191 cm^{-1} . En 902 y 864 cm^{-1} se observan los doblamientos del grupo C-H en el plano y fuera de este, que representan los grupos C-H en el esqueleto de la quitina.

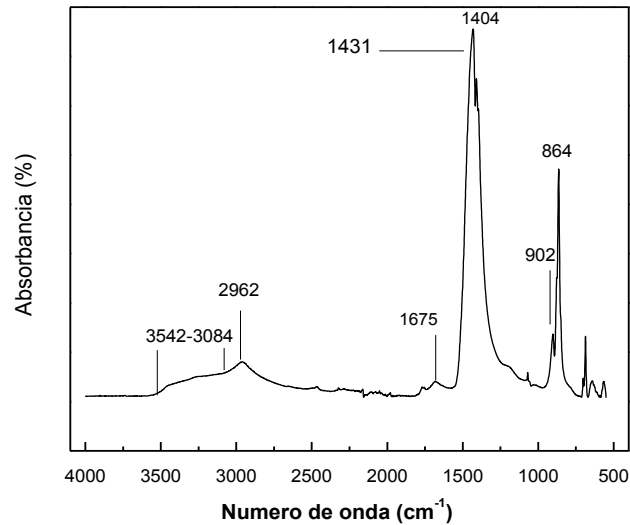
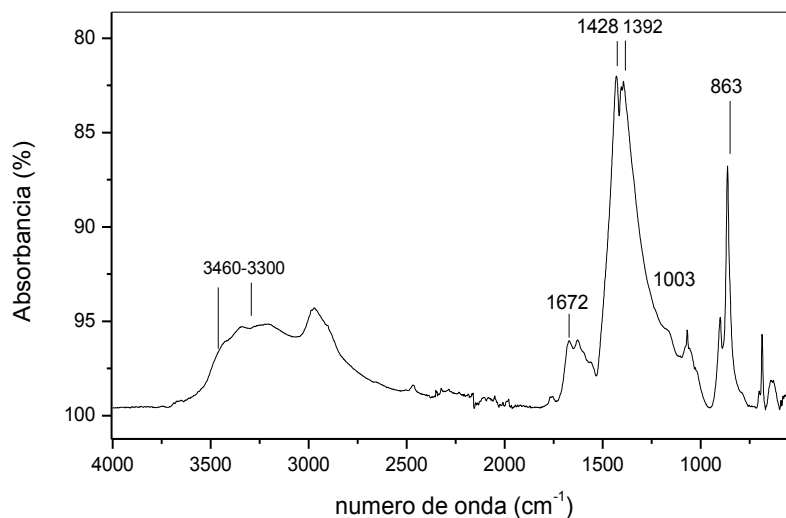


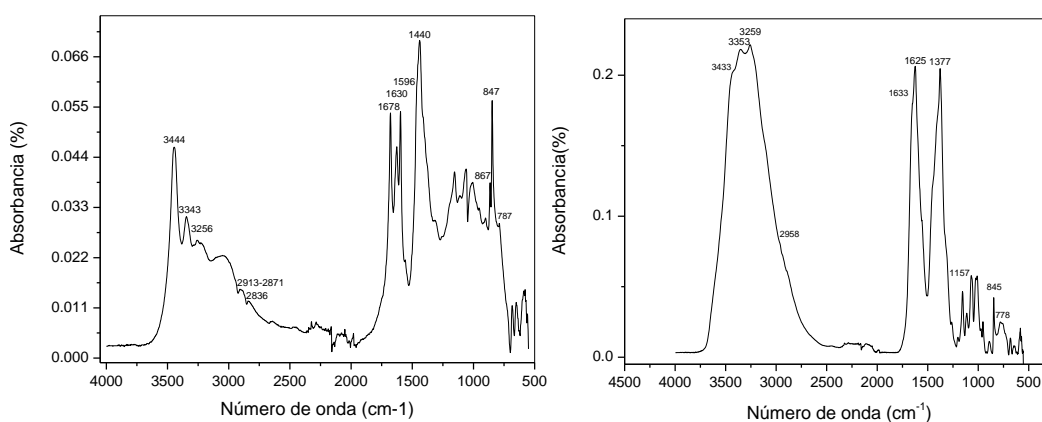
Figura 4.14. Espectro FTIR de QS

En la Figura 4.15 se presenta el espectro de FTIR de las NWQ_{AMEC} . El espectro presenta una banda característica de amidas secundaria en el rango de $3350-3180\text{ cm}^{-1}$, nuevamente se encuentran señales a 1671 y 1626 cm^{-1} a partir del enlace $\text{C}=\text{O}$ parcialmente sobrepuesta al enlace N-H que usualmente aparece en el rango $1640-1620\text{ cm}^{-1}$ apareciendo la banda del $\text{C}=\text{O}$ como un doblete, se observa que las intensidades son menores con respecto a el pico del enlace C-H , lo cual sugiere hay impedimentos que minimizan las frecuencias de los N-H y $\text{C}=\text{O}$, por asociaciones con los mismos grupos polares. Las vibraciones de los grupos CH_2 y CH_3 se observan a 1428 y 1392 cm^{-1} , además a 861 cm^{-1} se presenta una vibración de flexión fuera del plano para el enlace $=\text{C-H}$.


 Figura 4.15. Espectro FTIR de NWQ_{AMEC}

En la región de 3433 a 3259 de la figura 4.16 se encuentran las señales correspondientes a las amidas secundarias libres de la quitina, y los grupos $-OH$ presentes en la quitina y la astaxantina, se observa un traslape de bandas no definidas lo cual sugiere interacciones intermoleculares entre los grupos polares de las dos moléculas. Las señales de los grupos OH son desplazadas a frecuencias menores principalmente por asociaciones intramoleculares. El grupo $C=O$ presenta una señal intensa y definida en los NWQ en 1671 cm^{-1} , para la astaxantina el grupo $C=O$ presente en el grupo aromático presenta una señal en 1652 cm^{-1} , para NWQ-Ast_{AMEC-C1} una señal intensa y definida se observa a 1625 cm^{-1} .

De acuerdo a estudios previos los grupos $-C=C-$ de la cadena alifática en la astaxantina presentan una señal en 1552 cm^{-1} , la cual puede estar impedida por la intensidad de las señales del grupo $C=O$. finalmente, a 1377 cm^{-1} se localiza una flexión fuerte del CH_3 presente en la astaxantina. En el FTIR de la astaxantina se encuentra en 857 y 783 cm^{-1} las señales del anillo aromático, para el caso de los NWQ-Ast_{AEC-C1} se localizan estas señales en 845 y 778 cm^{-1} .



Figuras 4.16. y 4.17 Espectro FTIR NWQ-Ast_{AMEC-C1} y espectro FTIR NWQ_{AMEC-C2}

Tabla 4.1 Bandas características por FTR para NWQ_{AMEC}, Ast y NWQ-Ast_{AMEC-C1}

Grupo funcional	NWQ _{AMEC} (cm^{-1})	Ast (cm^{-1})	NWQ-Ast _{AMEC-C1} (cm^{-1})
OH		3427	3433
Amidas secundarias	3350-3180		3353-3259
Vibración de estiramiento $C=C$		1552	
Alquenos monosustituídos, dienos ($C-C$, $C=C$)		1634	1633
Vibración $C=O$ conjugado	1671-1626	1652	1625

Vibraciones de los grupos CH ₂ y CH ₃	1428 y 1392		
Vibraciones -flexión fuera del plano CH ₃		1366(m)	1377
Vibración: C-H y OH (β)		1280 (m)	1157
Vibración flexión fuera del plano, =C-H.	861		845
Curvas aromáticas p-benceno y m-benceno di-sustituídos		857 y 783	845 y 778

En la figura 4.17 se muestra el espectro del complejo NWQ_{AMEC-C2}, al haber menos concentración de la ast se observa una mejor definición de las señales tanto de quitina como de ast en el espectro.

La señales de las amidas secundarias se observan claramente en 3344-3256 cm⁻¹, a 3444 cm⁻¹, se observa el grupo OH en una señal ligeramente desplazada a bajas señales comparara al grupo OH's que se presentan en la astaxantina, (3427 y 3343 cm⁻¹). A diferencia del complejo con mayor concentración se observa una señal altamente definida lo cual indica que los grupos se encuentran libres. Para el grupo carbonilo se observa a 1678 cm⁻¹ a mayores longitudes de onda con respecto a quitina y astaxantina, esto sugiere que no predominan los puentes de hidrogeno con en este grupo funcional. La vibración del grupo C=C de la cadena de la astaxantina se observa en 1596 cm⁻¹, y la vibración fuera del plano de los grupos CH₃, se observa a 1440 cm⁻¹, se puede apreciar que con concentraciones menores de astaxantina se presentan menos asociaciones intermoleculares, lo cual deja en posibilidad de preservar la funcionalidad de la astaxantina.

Tabla 4.2 Bandas de absorción características por FTIR para NWQ-Ast_{AMEC-C2}

Grupo funcional	NWQ-Ast _{AMEC} (cm ⁻¹)	Astaxantina (cm ⁻¹)	NWQ-Ast _{AMEC-C2} (cm ⁻¹)
Amidas secundarias	3350-3180	-----	3444
Vibración de estiramiento del OH de la Ast	-----	3427	3343
Grupo metilo alifático CH	-----	2925 y 2850	2913-2871
Vibración de estiramiento C=O	1671 y 1626	1718	1678
Vibración del grupo C=C del astaxantina	-----	1552	1596
Alquenos monosustituídos, dienos en correlación con C=C	-----	1634	1630
Vibración de flexión fuera del plano CH ₃	-----	1366	1440
Doblamiento del grupo =C-H en el plano y fuera de este del	861	-----	867

esqueleto de la quitina			
Curvas aromáticas p-benceno y m-benceno disustituídos	-----	857 y 783	847 y 787

Para el espectro de FTIR de los NWQ obtenidos por ultrasonido (Figura 4.18) se observaron las señales características de la quitina, las cuales se presentan con mayor intensidad y bien definidas, predominando en la región 3460-3300 cm^{-1} una banda aguda intensa asociada a grupos amida secundarias libres, es decir no asociadas con otros grupos polares. Esta banda aparece en doblete debido a la presencia de isómeros cis-trans. Se presenta con mayor definición las señales del grupo C=O (1672 cm^{-1}) de la amida primaria y las vibraciones de estiramiento de amida II se presentan a 1591 cm^{-1} , se observan vibraciones de los grupos -C-H en los 1457 cm^{-1} . El enlace del C-O se identificó a 1148 cm^{-1} correspondiente a vibraciones de tensión asimétricas. Finalmente, en 1003 y 863 cm^{-1} encontramos los doblamientos del grupo C-H.

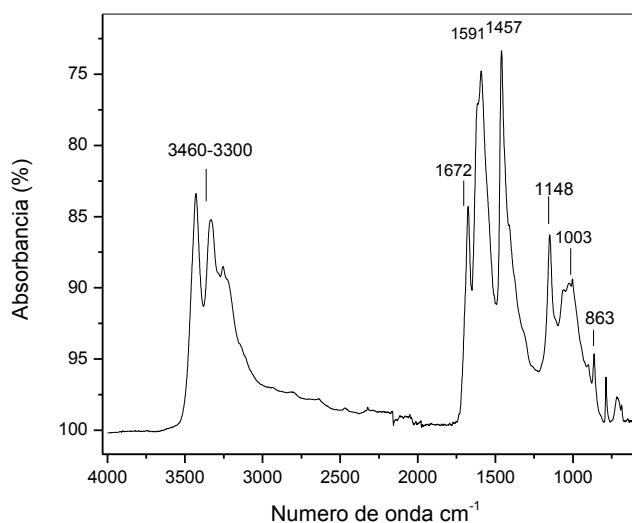
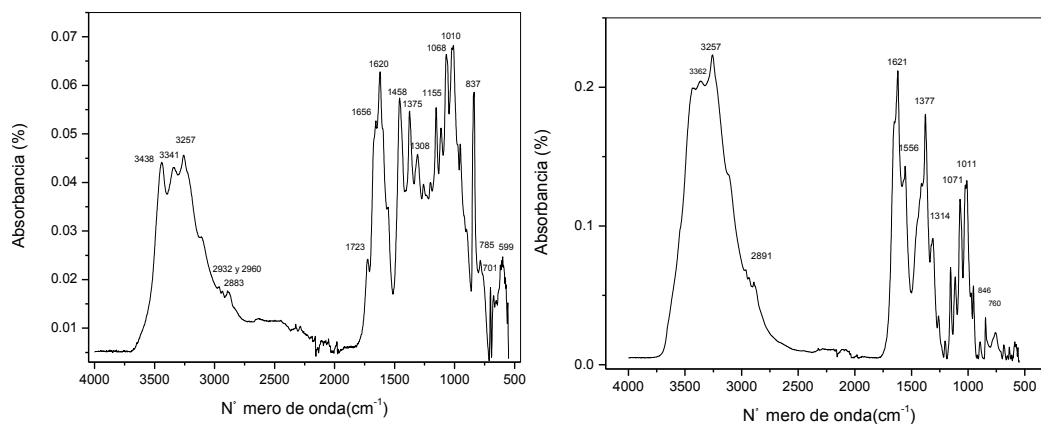


Figura 4.18. Espectro FTIR de NWQ_{US}

En la figura 4.19, se muestra el FTIR del NWQ-AST obtenido por ultrasonido, con alta concentración de astaxantina (2.848×10^{-7} mol), se observan las señales de las amidas secundarias de la quitina en 3362 cm^{-1} y 3257 cm^{-1} , el grupo C=O se observa en 1621 cm^{-1} , con un desplazamiento a frecuencias menores con respecto a la quitina y la astaxantina lo que indica la presencia puentes de hidrogeno con los grupos polares. En 1637 cm^{-1} se

encuentra la señal para los alquenos monosustituídos, dienos en correlación con estiramientos C-C y C=C de la cadena, esta señal corresponde a la Ast.

Bajo el método de ultrasonido se observan los grupos C=C a 1556 cm^{-1} correspondientes a la cadena central de la ast. Se muestra la vibración de flexión fuera del plano de los grupos metilo de la ast en 1377 cm^{-1} .



Figuras 4.19. y 4.20. Espectro FTIR NWQ-Ast_{US-C1} y Espectro FTIR NWQ_{US-C2}

Tabla 4.3 Bandas de absorción características por FTIR para NWQ-Ast_{US-C1}

Grupo funcional	NWQ/us (cm ⁻¹)	Astaxantina (cm ⁻¹)	NWQ-Ast _{US-C1} (cm ⁻¹)
Vibración de estiramiento OH	-----	3427	3362
Amidas secundarias de los NWQ	3460- 3300		3362 y 3257
Grupo metilo (C-H) de la cadena alifática	-----	2925 y 2854	2891
Estiramiento C=O	1672	1718	1621
Alquenos monosustituídos, dienos (C-C, C=C)	-----	1634	1637
Vibración C=C de la Ast	-----	1552	1556
Vibraciones de estiramiento de la amida II	1591	---	---
Vibraciones del C-H de la quitina	1457	-----	-----
Vibración de flexión fuera del plano CH ₃	-----	1366	1377
Vibración C-O y OH(β) de la Ast	-----	1280	1314
Vibración C-O	1148	1073	1071
Flexión fuera del plano C=C, =CH del anillo de la astaxantina	-----	970	1008
Doblamiento para C-H en el plano y fuera de este de la quitina	1003 y 863	-----	1023 y 760
Anillos aromáticos en ambos extremos de la cadena C-H p-benceno	-----	857 y 783	757 y 683

El espectro de los NWQ-AST con menor concentración de astaxantina se muestra en la Figura 4.20. Se observa una mayor definición de las señales de tanto de los NWQ como de

ast. El grupo hidroxilo se observa como un pico a 3438 cm^{-1} en los NWQ-Ast, los grupos amidas no presentan cambio. El grupo C=O se observa con un desplazamiento hacia la derecha con respecto a la astaxantina, el desplazamiento es menor con referencia a las muestras con mayor concentración de astaxantina.

Tabla 4.4 Bandas de absorción características por FTIR para NWQ-Ast_{US-C2}

Grupo funcional	NWQ _{US} (cm^{-1})	Astaxantina (cm^{-1})	NWQ-Ast _{US-C2} (cm^{-1})
Estiramiento OH	-----	3427	3438
Amidas secundarias de la quitina	3460-3300	-----	3460-3300
Estiramiento C=O	-----	1718	1656
Dienos	-----	1634	1620
Vibración C=C de la cadena de la astaxantina	-----	1552	1620
Vibración de flexión fuera del plano CH ₃	-----	1366	1458
Vibración C-O y OH(β) de la astaxantina	-----	1280	1155
Vibración C-O	1148	1073	1068
Flexión fuera del plano C=C	-----	970	1010
Curvas de los anillos aromáticos	-----	857 y 783	837 y 785

4.5 DIFRACCION DE RAYOS X (DRX)

La figura 4.21 muestra los patrones de difracción de la quitina solvatada con urea/NaOH. Se observa dos reflexiones cristalinas en 17.1° (2θ) y 20.8° (2θ) indexada en 120, la primera corresponde a quitina anhidra y la segunda es característica de α -quitina (Zhang *et al*, 2005 y Jang *et al*, 2004). No se observan picos cristalinos característicos de quitina a $9.1-9.2^\circ$ (2θ) y $19.1-19.2^\circ$, que sugieren un decremento en la cristalinidad de la quitina bajo el complejo formado con la urea y el NaOH. Se observan reflexiones característicos de la urea a en 2θ : 24.6 , 29.3 , y 35.5° , este compuesto presentan una simetría ordenada (Medina *et al*, 1992). También se encontraron reflexiones para el NaOH en 15.2 , de $31-38$ y $52-53^\circ$ 2θ . Se obtuvo para quitina solvatada un % de cristalinidad del 42.85%.

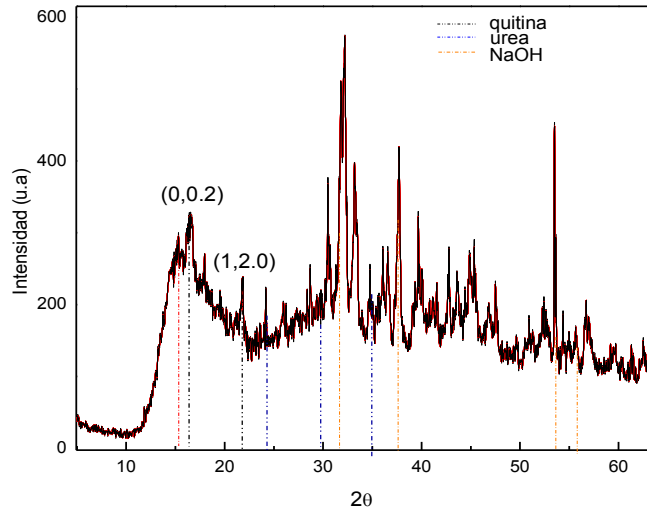


Figura 4.21. Difractograma RX de QS

Tabla 4.5 Patrones PDF de la α -quitina

d	2θ	I	h	k	l
5.16000	17.171	80	0	0	2
4.25000	20.885	10	1	2	0

Tabla 4.6 Patrones PDF de la urea

d	2θ	I	h	k	l
3.61000	24.641	40	1	0	1
3.04000	29.356	53	1	1	1
2.52000	35.598	20	2	1	0

Tabla 4.7 Patrones PDF del NaOH

d	2θ	I
5.80000	15.264	60
2.85000	31.362	60
2.40000	37.442	100
2.34000	38.439	100
1.73000	52.880	90
1.70000	53.888	90
1.65000	55.660	60

La figura 4.22 muestra el difractograma por DRX de los nanowhiskas tratados con Agitación mecánica. Se observa un máximo de difracción intenso, aproximadamente a 19.2° (2 θ), y se observa la reflexión a 9.3° (2 θ) el cual es característico de quitina cristalina, también se observa una reflexión a 26° (2 θ) la cual corresponde al agua. A través del análisis de los nanowhiskas de quitina se pueden apreciar las señales que corresponden a

quitina sólida, en donde las moléculas están organizadas en regiones cristalinas y coexisten en regiones amorfas.

La quitina solvatada, los nanowhiskas presentan reflexiones correspondientes a la Urea en 2θ : 29.3, y 35.9. Se encontraron reflexiones para el NaOH en 2θ : 15.2 y 37.4°. Para los NWQ obtenidos por agitación mecánica se obtuvo 75.431% de cristalinidad.

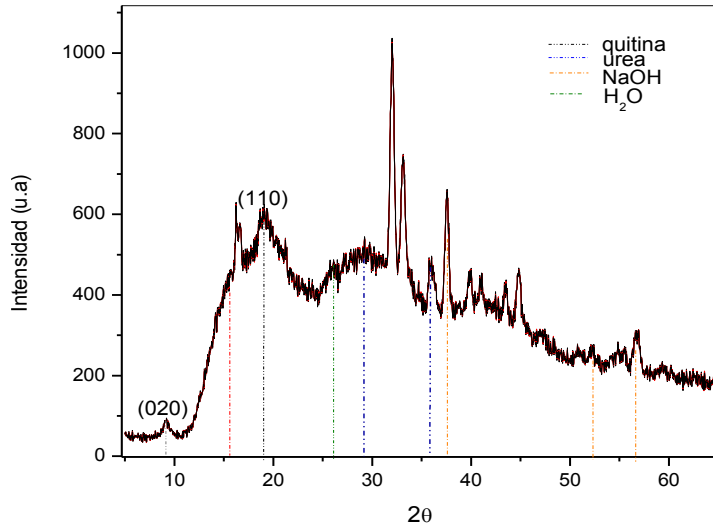


Figura 4.22. Difractograma RX de NWQ_{AMEC}

Tabla 4.8 Patrones PDF de la α -quitina

d	2θ	I	h	k	l
9.0000	9.302	80	0	2	0
4.6000	19.280	100	1	1	0

Tabla 4.9 Patrones PDF de la urea

d	2θ	I	h	k	l
3.04000	29.356	53	1	1	1
35.598	20	20	2	1	0

La figura 4.23 se muestran los resultados de DRX correspondiente a los NWQ-Ast_{AMEC-C1}. En el difractograma de NWQ con agitación A. mecánica con mayor concentración de astaxantina, se muestran reflexiones intensas a través de los índices de Miller en (110) en 19.2° (2θ) y otros de menor intensidad en (020) en 9.3° y (003) en 25° (2θ) correspondientes a quitina. Presentándose además reflexiones para la urea en 29.3 y 35.9° (2θ) y para el NaOH en 15.2 y 37.4° (2θ). Se muestran reflexiones para la Trona ($\text{Na}_3(\text{CO}_3)_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en 9.0, 18.1, 29.0, 33.8 y 36.7° (2θ), la trona es carbonato hidratado de sodio,

dicho compuesto proviene de la reacción entre el NaOH y los restos minerales, principalmente carbonatos que la quitina presenta en su forma comercial. Además, se determinó el grado de cristalinidad de los NWQ-Ast_{AMEC-C1}, siendo este del 54.85%. Lo anterior sugiere que altas concentraciones de astaxantina promueven la disociación de la quitina con el NaOH, generando la formación de trona, y de esta manera la antoxantina interacciona directamente con la quitina, prevaleciendo un mayor grado de cristalinidad.

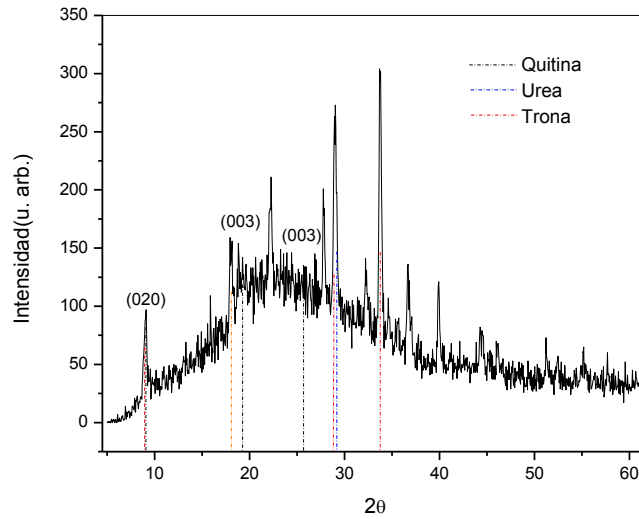


Figura 4.23 Difractograma RX de NWQ-Ast_{MEC-C1}

Tabla 4.10 Patrones PDF de la Trona

d	2θ	i	h	k	l
9.77000	9.044	45	2	0	0
4.89200	18.119	55	4	0	0
3.07100	29.053	80	-6	0	2
2.64700	33.837	100	4	1	1
2.44400	36.743	30	-2	1	3
2.25400	39.967	30	-6	0	4
2.02900	44.623	30	8	0	2

Tabla 4.11 Patrones PDF de la Urea

d	2θ	i	h	k	l
4.00000	2.2206	100	1	1	0
3.61000	24.641	40	1	0	1
3.04000	29.356	53	1	1	1

d	2θ	I	h	k	l
---	----	---	---	---	---

Tabla 4.12 Patrones PDF de la α-quitina

d	2θ	i	h	k	l
9.50000	9.302	80	0	2	0
5.16000	17.171	80	0	0	2
4.92000	18.015	80	0	1	2
4.60000	19.280	100	1	1	0
3.44000	25.879	100	0	0	3
2.32000	38.784	80	0	6	3

En la figura 4.24 se muestran el difractograma de los NWQ-Ast_{AMEC-C2}, en donde se identifican reflexiones para la urea en 29.3° (2θ) y para la quitina en 9.3, 19.2 y 25.8° (2θ), para el NaOH solamente en 52.5° (2θ), no se observan todas las señales identificadas previamente en NWQ sin astaxantina y tampoco se encuentra trona. El porcentaje de cristalinidad fue de 55.24%, mayor que en el caso de los whiskas obtenidos por el mismo tratamiento y con mayor concentración de astaxantina.

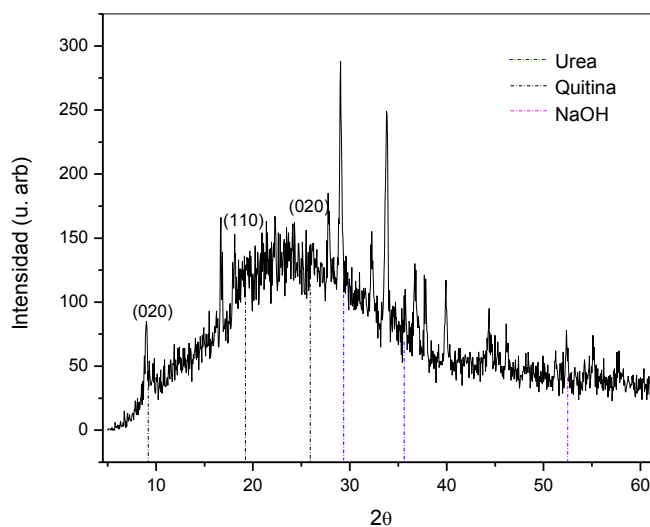


Figura 4.24. Difractograma RX de NWQ-Ast_{AMEC-C2}

Tabla 4.13 Patrones PDF de la α-quitina

9.50000	9.302	80	0	2	0
5.16000	17.171	80	0	0	2
4.92000	18.015	80	0	1	2
4.60000	19.280	100	1	1	0
3.75000	23.707	80	1	3	0
3.44000	25.879	100	0	0	3
2.32000	38.784	80	0	6	3

Tabla 4.14 Patrones PDF de la urea

d	2θ	I	h	k	l
4.00000	22.206	100	1	1	0
3.61000	24.641	40	1	0	1
3.04000	29.356	53	1	1	1
2.52000	35.598	20	2	1	0

Tabla 4.15 Patrones PDF de la NaOH

d	2θ	I	h	k	l
4.00000	22.206	100	1	1	0
3.61000	24.641	40	1	0	1
3.04000	29.356	53	1	1	1
2.52000	35.598	20	2	1	0

Los nanowhiskas de quitina sin astaxantina, obtenidas con tratamiento de ultrasonido mostraron patrones similares a los nanowhiskas con agitación mecánica, sin embargo se observó que las señales presentan picos más agudos y con mayor definición.

En la figura 4.25, se muestran reflexiones en 17.1° (2θ), 20.8° (2θ) indexada a (120) y 23.7° (2θ) indexada a (101), de acuerdo a (Jang *et al.*, 2004) se encontró que picos cristalinos en 9.6° , 19.6° , 21.1° y 23.7° que son correspondientes a α -quitina., para la definición de los patrones es importante considerar también la fuente de origen de la quitina (Cárdenas, 1993 y Prashanth, 2002) en este caso se utilizó quitina obtenida de cangrejo.

Finalmente, la reflexión a 16.3° (2θ) es atribuida a quitina anhidra. Además no se identificaron reflexiones para urea de acuerdo a los patrones PDF, como en el caso de los dos resultados anteriores, así también se puede determinar que el método por ultrasonido

promueve una mayor dispersión de los cristales de quitina. En los NWQ por ultrasonido se obtuvo un mayor grado de cristalinidad, con un valor de 78.143%.

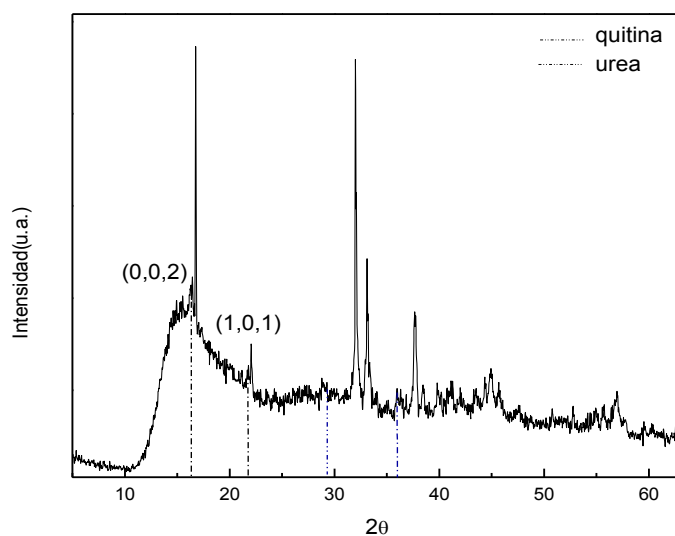


Figura 4.25. Difractograma RX de NWQ_{US}

Tabla 4.16 Patrones PDF de α -quitina

d	2θ	I	h	k	l
5.16000	17.171	80	0	0	2
4.25000	20.885	10	1	0	1

Tabla 4.17 Patrones PDF de urea

d	2θ	I	h	k	l
3.61000	24.641	40	1	0	1
3.04000	29.356	53	1	1	1
2.52000	35.598	20	2	1	0

Tabla 4.18 Patrones PDF de NaOH

d	2θ	I
5.80000	15.264	60
2.85000	31.362	60

2.40000	37.442	100
2.34000	38.439	100
1.73000	52.880	90
1.70000	53.888	90
1.65000	55.660	60

El difractograma (figura 4.26) de los NWQ-Ast_{US-C1} se registran intensidades para Trona en 9.0, 18.1, 29.0 y 33.8° (2θ). A diferencia de los NWQ sin astaxantina obtenidos por este método, se observa claramente la presencia de urea en 22.2 y 29.3° (2θ). Así también se observan reflexiones en 17.1 y 23.7° (2θ), para la quitina. La determinación del grado de cristalinidad es de 51.95%, menor que en los obtenidos por agitación mecánica. Con estos resultados se manifiesta nuevamente que la presencia de ast permite disociar el complejo Quitina-NaOH-urea, además que al obtenerse una mayor dispersión de los whiskas por el método de ultrasonido, la formación de bicarbonatos de sodio y la interacción astaxantina-quitina es más factible, y con ello se contribuye a una menor cristalinidad y pérdida de morfología, lo cual confirma los resultados por MEB.

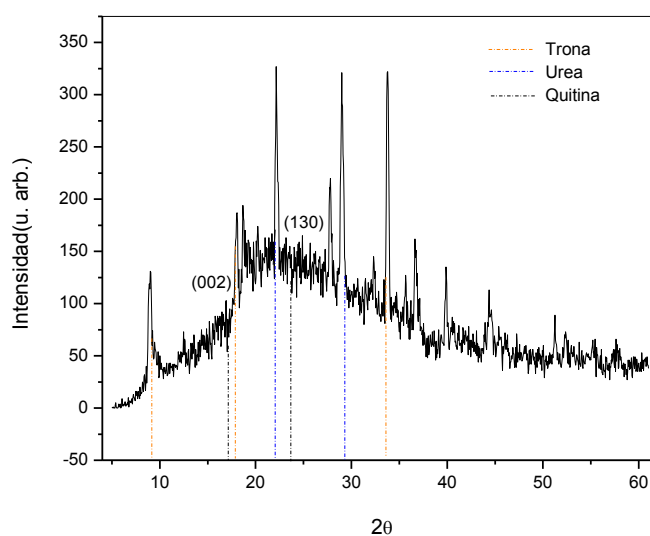


Figura 4.26. Difractograma de RX de NWQ-Ast_{US-C1}

Tabla 4.19 Patrones PDF de trona

d	2θ	I	h	k	l
9.77000	9.044	45	2	0	0
4.89200	18.119	55	4	0	0
3.07100	29.053	80	-6	0	2

2.64700	33.837	100	4	1	1
----------------	--------	-----	---	---	---

Tabla 4.20 Patrones PDF de urea

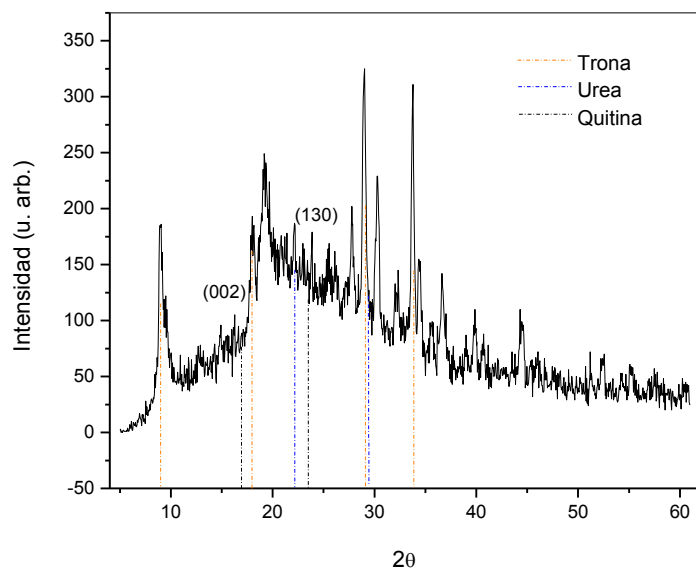
d	2θ	I	h	k	l
4.00000	22.206	100	1	1	0
3.61000	24.641	40	1	0	1
3.04000	29.356	53	1	1	1

Tabla 4.21 Patrones PDF de α-quitina

d	2θ	I	h	k	l
9.50000	9.302	80	0	2	0
5.16000	17.117	80	0	0	2
4.92000	18.015	80	0	1	2
4.60000	19.280	100	1	1	0
3.75000	23.707	80	1	3	0
3.44000	25.879	100	0	0	3
2.32000	38.784	80	0	6	3g

Finalmente (Figura 4.27) las reflexiones a través de sus respectivos planos de Miller en los NWQ-AstUS-C2 se identificaron reflexiones de la trona en 9.0, 18.1, 29.5 y 33.8° (2θ); para la urea en 22.2 y 29.3° (2θ) y para la quitina en 17.1 y 23.7° (2θ). Se obtiene menor cristalinidad de 50.69% en las muestras con menor concentración de astaxantina.

De acuerdo a Long Hong *et al*; la astaxantina presenta reflexiones en 12.0, 22.8, 24.0 y 24.4°, en las muestras analizadas no se observan claramente debido a las bajas concentraciones de astaxantina incorporadas a los NWQ.


 Figura 4.27 Difractograma RX de NWQ-Ast_{US-C2}
Tabla 4.22 Patrones PDF de Trona

D	2θ	I	h	k	l
9.77000	9.044	45	2	0	0
4.89200	18.119	55	4	0	0
3.07100	29.053	80	-6	0	2
2.64700	33.837	100	4	1	1

Tabla 4.23 Patrones PDF de urea

d	2θ	I	h	k	l
4.00000	22.206	100	1	1	0
3.61000	24.641	40	1	0	1
3.04000	29.356	53	1	1	1

Tabla 4.24 Patrones PDF de α-quitina

d	2θ	I	h	k	l
9.50000	9.302	80	0	2	0
5.16000	17.171	80	0	0	2
4.92000	18.015	80	0	1	2
4.60000	19.280	100	1	1	0
4.25000	20.885	10	1	0	1
4.25000	20.885	10	1	2	0
3.75000	23.707	80	1	3	0
3.44000	25.879	100	0	0	3
2.32000	38.784	80	0	6	3

4.6 TAMAÑO DE PARTÍCULA

En la tabla 4.24 se muestran los resultados obtenidos de tamaño de partícula de las muestras obtenidas en la primera etapa experimental para la formación de Quitina Solvatada (QS) y Nanowhiskas de Quitina (NWQ). Se puede observar que los nanowhiskas obtenidos con ultrasonido mostraron el menor tamaño de partícula, por lo cual este método permite una mayor disgregación de las nanofibras de quitina.

Tabla 4.25 Tamaño de partícula QS, NWQ_{AMEC}, NWQ_{US}

Muestra	Media (nm)	Moda (nm)	Desviación estándar (nm)
QS	225	50	229
NWQ_{AMEC}	92	31	78
NWQ_{US}	68	29	64

En una segunda etapa experimental se obtuvieron los NWQ-Ast, por los dos métodos (Ag. Mecánica y ultrasonido) y con dos concentraciones de Ast. En la tabla 4.25 se observa que no hay una relación directa proporcional a la concentración de astaxantina, sin embargo es claro el incremento del tamaño de partícula por la incorporación de astaxantina a los NWQ. El tratamiento que arroja los mejores resultados son los NWQ-Ast_{US} con mayor concentración de astaxantina.

Tabla 4.26 Tamaño de partícula NWQ-Ast_{AMEC-C1,C2} y NWQ-Ast_{US-C1,C2}

Muestra	Media (nm)	Moda (nm)	Desviación estándar (nm)
NWQ-Ast_{AMEC-C1}	156	107	94
NWQ-Ast_{AMEC-C2}	146	118	59
NWQ-Ast_{US-C1}	124	96	63
NWQ-Ast_{US-C2}	154	113	88

4.7 Análisis Termogravimétrico (TGA)

En la figura 4.28 se muestra la curva a) TG y b) DTG de la quitina pura. Donde se presenta una inicial pérdida de masa de la quitina en 78.1°C , causada por liberación de agua (por rompimiento de enlaces). Por la estructura de la quitina los sitios donde el agua interacciona son los grupos hidroxilo (OH's) y los grupos amino (NH_2). Se reconoce que los polisacáridos presentan alta afinidad a los grupos polares y pueden fácilmente hidratarse dando resultado a moléculas con estructuras desordenadas.

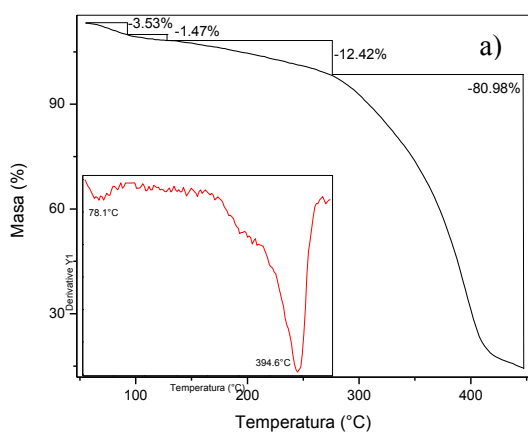


Figura 4.28 Curva TG-DTG de Quitina pura

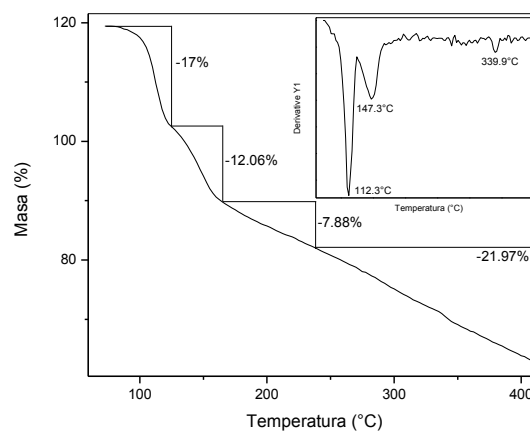


Figura 4.29 Curva TG-DTG de Quitina solvatada

Adicionalmente, se presenta una segunda descomposición térmica en un orden de 93.4% a una temperatura de máxima pérdida a 394.6°C , debida a la depolimerización del polisacárido, con una subsecuente pérdida de compuestos volátiles.

En la figura 4.29 se presentan dos pérdidas de masa principales a 112.3°C y 147.3°C , la primera por la pérdida de agua, según Zawadzki *et al*, 2010 significa que el agua podría ser absorbida o débilmente unida a las moléculas de quitina a través de enlaces por puente de hidrogeno, en quitina solvatada se presenta mayor absorción de agua debido a la mayor intensidad en 112.3°C . La segunda pérdida en peso se observó a 147.3°C la cual se atribuye al inicio de la termo descomposición de la urea, las cual se da totalmente a una temperatura próxima a los 160°C , produciendo, gases como CO_2 y cianatos de amonio. Mientras la pérdida de masa en 339.9°C es atribuida a la separación de las unidades monoméricas de la quitina.

En la figura 4.30 se muestra el comportamiento térmico de los nanowhiskas de quitina con mayor concentración de astaxantina, la degradación de 92.3°C se atribuye a la pérdida de agua del complejo formado. La pérdida de masa a 121.8°C puede atribuirse a la pérdida de agua ligada principalmente en los grupos hidroxilos a 168.7°C se observa una pérdida de masa del orden de 10.12% debida a la degradación de urea, finalmente, una temperatura de máxima pérdida de quitina se observa a en 343°, en este caso al encontrar una degradación a una mayor temperatura que en los whiskas de quitina se puede decir que estos con astaxantina son térmicamente más estables.

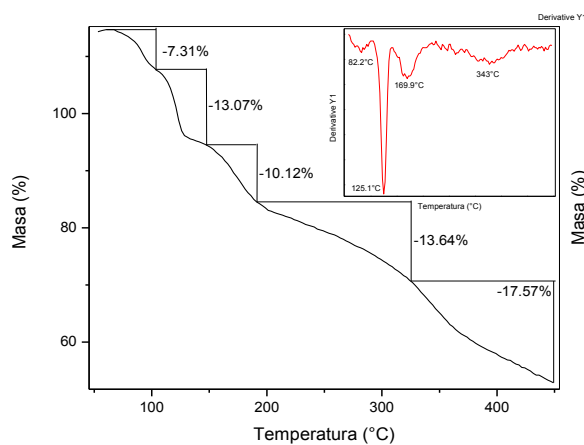


Figura 4.30 Curva TG-DTG de NWQ-Ast_{A.MEC-C1}

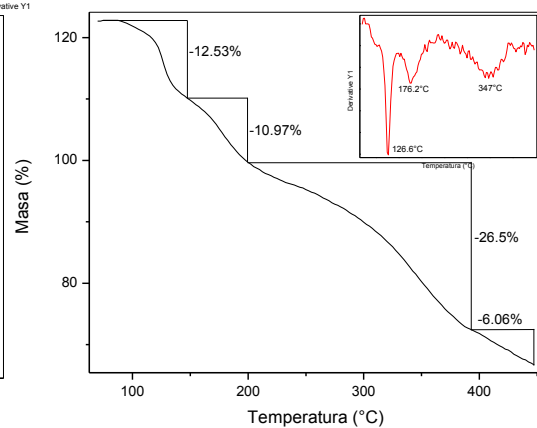


Figura 4.31 Curva TG-DTG NWQ-Ast_{A.MEC-C2}

En el termograma de la figura 4.31 correspondiente a los NWQ con menor concentración de ast, se puede observar que la mayor pérdida de peso en 126.6°C se debe a la pérdida de agua de nanowhiskas obtenidos por agitación mecánica. Una segunda pérdida de masa de un 10.97% a una temperatura de 176.2°C es originada por la descomposición de urea. La degradación de la quitina se observa en 347°C, esta temperatura es ligeramente mayor que en NWQ-Ast_{A.MEC-C1}, determinando que los NWQ mejoran su estabilidad térmica en comparación con la quitina solvatada.

La figura 4.32 correspondiente a los NWQ con Ast, obtenidos por el método de ultrasonido con mayor concentración de astaxantina, se observan cuatro pérdidas de peso. La primera a una máxima temperatura en 82.2°C y la segunda en 125.1°C debida a la pérdida de agua tanto absorbida como agua ligada. En 169.9°C en un orden de 11.40% corresponde a la

urea nuevamente. La máxima pérdida de peso para quitina se observa a 327.7°C. Se puede observar que los NWQ obtenidos por ultrasonido presentaron para las dos concentraciones menor estabilidad térmica con respecto a los NWQ obtenidos por agitación mecánica. (Fig.4.32)

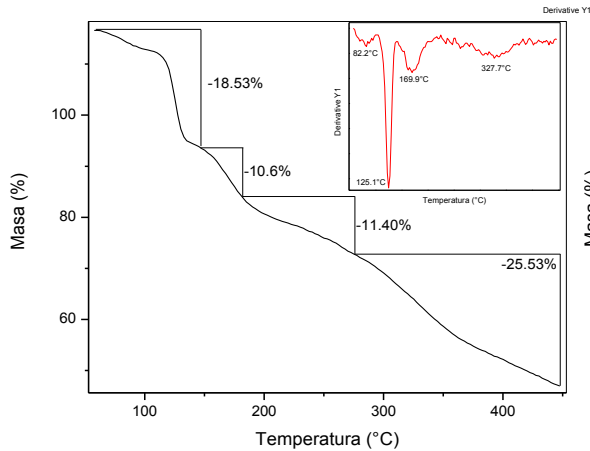


Figura 4.32 Curva TG-DTG NWQ-AstUS-C1

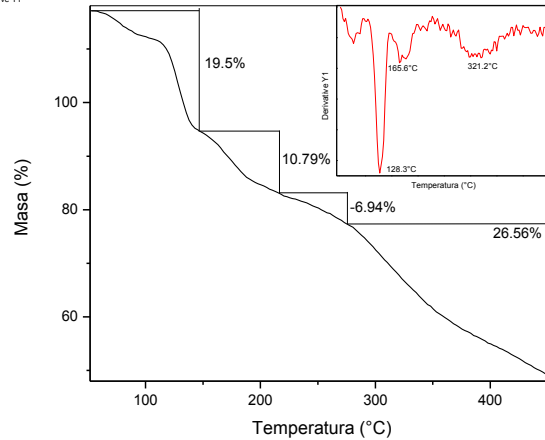


Figura 4.33 Curva TG-DTG NWQ-AstUS-C2

Finalmente en la figura 4.33 se muestra los resultados obtenidos para los NQW-AstUS con menor concentración de ast. Se observó un comportamiento similar al obtenido por los NQW con mayor concentración de Ast. Se evidenció la pérdida en peso a una temperatura máxima para quitina en 321.2°C.

Comparando de las dos muestras de los nanowhiskas de quitina con astaxantina bajo el tratamiento de ultrasonido, se puede determinar que la de mayor estabilidad térmica se presentó en aquellos con el mayor contenido de astaxantina. También se puede determinar que de acuerdo al tratamiento de agitación mecánica y ultrasonido, en agitación mecánica se presentan mejores resultados para la estabilidad térmica en los NWQ.

4.8 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

En la figura 4.34 Curva DSC de quitina se encuentra un primer pico alrededor de 68.7°C, el pico que inicia en 393.1°C, a partir de ahí ocurre la degradación de la matriz de quitina (Juárez *et al*, 2012). En el intervalo de 270 a 360°C puede se pueden atribuir a principios de desnaturalización y degradación de la quitina. Dos picos exotérmicos son relacionados a la

descomposición por los grupos aminos (GlcN) y residuos acetilos (GlcAc), característicos de la quitina (L.S. Guinesi, E.T.G. Cavalheiro, 2006).

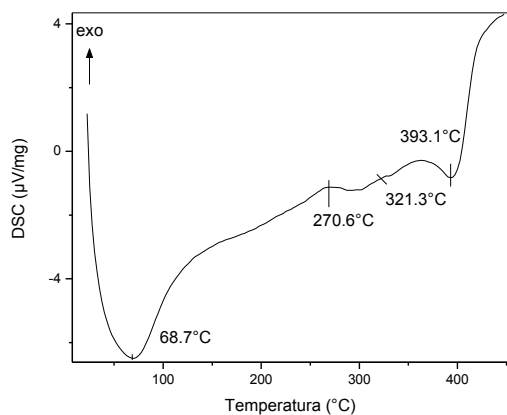


Figura 4.34 Curva DSC de Quitina pura

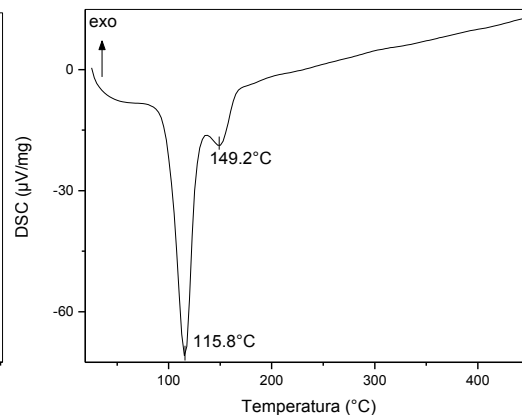


Figura 4.35 Curva DSC de QS

En la figura 4.35 se muestra la curva DSC de la Quitina solvatada el pico endotérmico que se observa en 115.8°C está relacionado a un proceso de deshidratación de la cadena polimérica y se encontró un pico en 149.2°C que se puede atribuir a la pérdida los sustituyentes en el complejo como son urea e hidróxido de sodio. No se observa otra transición térmica claramente a temperaturas mayores debido a que la quitina esta solvatada, generalmente la quitina con sustituyentes presenta transiciones de temperatura correspondientes a depolimerización arriba de 400°C. La Tg de quitina no se observa bajo las condiciones de medición experimentales realizadas.

En la figura 4.36 en la curva DSC, los primeros dos picos endotérmicos presentes en 92.2 y 122.7°C se atribuyen a la pérdida de agua en los nanowhiskas de quitina con mayor concentración de astaxantina obtenidos por agitación mecánica. En 172.4°C se observa una transición endotérmica que se debe a la termo descomposición de la urea principalmente, una transición se observa 240°C la cual corresponde a la degradación de la astaxantina y finalmente en 317.8°C aparece una pico exotérmico pequeño que corresponde a la descomposición de la cadena principal de la quitina.

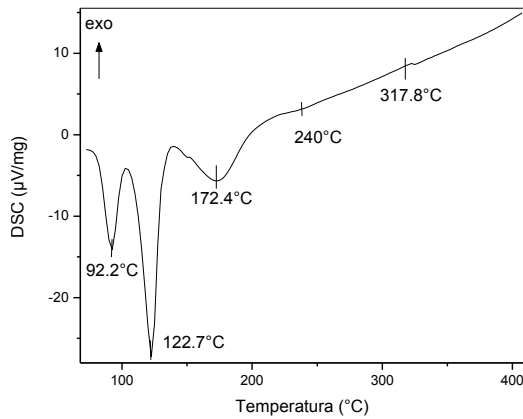


Figura 4.36 Curva DSC de NWQ-Ast_{A.ME-C1}

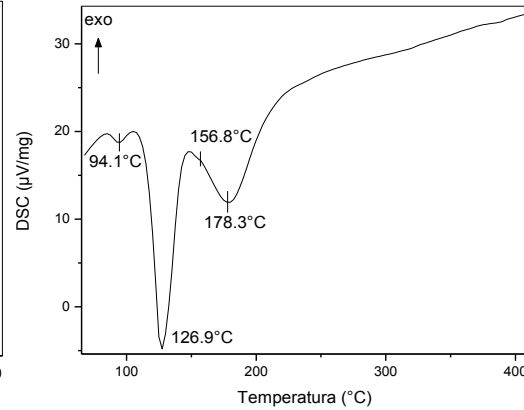


Figura 4.37 Curva DSC de NWQ-Ast_{A.MEC-C2}

En la figura 4.37 correspondiente al DSC de los NWQ con menor concentración de astaxantina se encuentran dos picos endotérmicos por la pérdida de agua y urea muy similares a los presentados en los NWQ con mayor concentración de ast. Sin embargo se observó una transición exotérmica en 178 °C mayor que la observada en NWQ que tienen mayor concentración de ast. Por lo tanto, para el tratamiento con ag. mecánica se puede decir que a bajas concentraciones de astaxantina los NWQ conservan una buena estabilidad similar a la quitina pura.

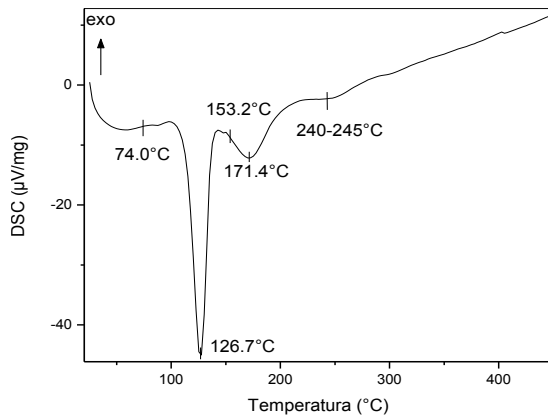


Figura 4.38 Curva DSC de NWQ-Ast_{US-C1}

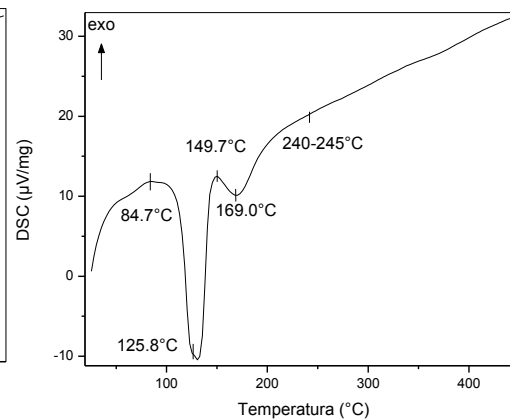


Figura 4.39 Curva DSC de NWQ-Ast_{US-C2}

Las curvas DSC de las figuras 4.38 y 4.39 corresponden a los NWQ con mayor y menor concentración de astaxantina obtenidos por ultrasonido. Los dos picos endotérmicos iniciales con ligeros desplazamientos a temperaturas mayores en los NWQ con mayor ast, es indicativo de que hay deshidratación en el complejo formado.

Un tercer pico endotérmico en 171.4 y 169°C que marca el inicio de la descomposición de la urea. Se observa en las dos muestras una ligera transición exotérmica asociada a la astaxantina en temperaturas de 240-245°C. No se observa claramente la temperatura máxima de depolimerización de la quitina, sin embargo es notorio que es superior en todos los casos a la quitina solvatada y a la astaxantina.

4.9 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN

La tabla 4.26 muestra los análisis preliminares con los porcentajes de inhibición del radical DPPH para la muestra NWQ-Ast_{US-C1} con concentración de 0.02g en dos distintas absorbancias de 517nm y 570 nm. La anterior prueba se realizó para la valorar la longitud de absorbancia óptima de la astaxantina y de los NWQ.

Los espectros de absorción de los carotenoides son generalmente bandas intensas en la región del visible, la banda de absorción es atribuida a la transición S₀-S₂ (R.L. Christensen, 1999 y B.S. Hudson, 1982 in C. Köpsel et al. 2005). El máximo de absorción de la astaxantina en acetona es en 478 nm. El máximo de absorción cambia al adicionar agua a la solución de acetona, por ejemplo en una relación de 3:7 acetona agua los máximos de absorbancia se registraron en 520 y 562nm. Por lo anterior, considerando que en el sistema NWQ-Ast se disolvió en acetona se pudo determinar que el máximo de absorción obtenido fue a una longitud de onda de 570 nm.

Tabla 4.27 Porcentaje de inhibición de NWQ-Ast_{US-C1}

Corrida/Absorbancia (nm)	% Inhibición	
	517	570
1 ^a	24.58	75.67
2 ^a	23.84	72.35
3 ^a	24.49	-----

Una vez que se valoró la longitud de onda para la lectura de las muestras, se determinó la mejor concentración de ast en los NWQ para evaluar su funcionalidad.

En la tabla 4.27 se presentan los análisis preliminares del % de inhibición obtenido de la muestra NWQ-Ast_{A.MEC-C1}, en absorbancia de 570nm, para dos concentraciones de muestra (0.02 y 0.04 g) para la obtención del extracto antioxidante. Se pudo determinar que los mejores resultados fueron obtenidos en las muestras de 0.02 g.

Tabla 4.28 Porcentaje de inhibición de NWQ-Ast_{US-C1}

Corrida/Concentración (g)	% Inhibición	
	0.02	0.04
1 ^a	51.20	44.29
2 ^a	54.67	49.19
3 ^a	53.64	47.79

En la tabla 4.28 se presentan los resultados las muestras de los NWQ-Ast, obtenidos tanto por agitación mecánica como por ultrasonido, en absorbancia en 570nm y concentración de muestra para obtención del extracto antioxidante de 0.02g. Los resultados muestran que los mayores porcentajes de inhibición, en las muestras de NWQ-Ast_{A.MEC-C2} y NWQ-Ast_{SUS-C2}. A su vez las muestras con menor concentración de ast y obtenidas por ultrasonido fueron las que arrojaron los mejores resultados en promedio (56.41 % de inhibición). El % de inhibición se refiere a la cantidad de DPPH neutralizado, es decir la captación del radical libre DPPH por parte de la astaxantina (especie antioxidante).

Tabla 4.29 Resultados finales del % de inhibición

Corrida/Muestra	% Inhibición de NWQ-Ast			
	A.MEC-C1	A.MEC-C2	US-C1	US-C2
1a	51.20	56.72	55.75	60.96
2a	54.67	55.05	51.08	47.64
3a	53.64	47.83	57.79	60.63
Promedio	53.13	53.19	54.87	56.41

CAPITULO 5. CONCLUSIONES

- De acuerdo a los objetivos planteados se concluye lo siguiente:
- Se obtuvieron NWQ a nivel nanométrico, los mejores resultados con respecto al tamaño, fueron a partir de los NWQ_{AMEC}. Lo anterior fue evidenciado por los análisis de MEB y tamaño de partícula, también se pudo determinar que las nanofibras presentaron crecimientos hacia el exterior de la superficie de la muestra, y manojos varias terminaciones lo cual permite que existe un área superficial útil para funcionalizar.
- Una vez integrada la Ast a los NWQ, se obtuvo una mayor homogeneidad en los tamaños de fibras a escala nanométrica en el proceso de AMEC con bajas concentraciones de Ast.
- De acuerdo al segundo objetivo particular se determinaron las asociaciones de los NWQ con astaxantina, en base a los resultados de MEB y LSMC se puede indicar que a bajas concentraciones de Ast, se mantiene una alta afinidad de la quitina y astaxantina, conservándose las formas afiladas recubiertas por Ast. Sin embargo a mayores concentraciones las interacciones por puente de hidrogeno intra moleculares de la quitina son reducidas y se generan arreglos amorfos, independientemente del método de obtención de los NWQ.
- El análisis de estructural por FTIR permitió conocer la interacción intramolecular e intermolecular de la quitina, Ast y del complejo obtenidos.
- Para QS y NWQ_{AMEC} se mostró la presencia de interacción entre los grupos polares impidiendo la vibración en los enlaces libres, por el contrario, en los NWQ-Ast_{US}, se presentaron grupos amidas libres, lo que le permite interaccionar con la astaxantina.

- Una vez integrada la Ast, los complejos NWQ-Ast_{AMEC} y los NWQ-Ast_{US} con alta concentración de Ast presentaron interacciones intermoleculares por puentes de hidrogeno entre la quitina y la astaxantina, sin embargo esto limita la posibilidad de interactuar de la Ast con otras moléculas.
- Se ha corroborado formación de la estructura del modelo propuesto de vaina en la formación de los NWQ, el arreglo propuesto no afecta la capacidad de los NWQ de alojar a la Ast.
- Los NWQ-Ast_{AMEC} con menor concentración de Ast mostraron mayores porcentajes de cristalinidad, los NWQ son regiones cristalinas, que al prevalecer su arreglo morfológico y estructural proveen un soporte con mayor estabilidad térmica al complejo obtenido.
- El estudio por TGA y DSC mostraron que los NWQ-Ast_{AMEC-C2}, tienen mejor estabilidad térmica, lo cual es congruente con el grado de cristalinidad obtenido por DRX.
- De acuerdo a los resultados de la funcionalidad de los NWQ-Ast, en base al porcentaje de inhibición se concluye que los mejores resultados se obtuvieron en los NWQ con menores concentraciones de astaxantina, por lo que complejo NWQ-Ast tiene la capacidad de incorporar pequeñas concentraciones de Ast manteniendo su capacidad antioxidante.

Conclusión General.

Se corroboró la formación del modelo propuesto para la solvatación de la quitina con el uso de un solvente ecológico. Los NWQ propuestos tienen la capacidad de albergar moléculas bioactivas sin afectar la funcionalidad de las mismas, además de proveer un soporte con alta estabilidad térmica, por lo anterior los NWQ se proyectan como un sistema de protección con gran potencial para su uso en áreas como alimentos o biomédica.

5.1 Propuestas

- a) Plantear un estudio para ampliar el conocimiento sobre el comportamiento mecánico del complejo NWQ-Ast, bajo la misma estrategia experimental que se llevó a cabo en este proyecto, con la finalidad de valorar su uso en aplicaciones industriales.
- b) Hacer un estudio y evaluación de la estabilidad del complejo NWQ-Ast ante luz Uv y pH
- c) Valorar el uso de otras sustancias bioactivas en diferentes concentraciones.
- d) Realizar un análisis teórico molecular para corroborar los resultados experimentales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araki J.**, Yamanaka Y. and Ohkawa K. 2012. Chitin-chitosan nanocomposite gels: reinforcement of chitosan hydrogels with rod-like chitin nanowhiskers. *Polymer journal* 44, 713-717.
- Britton, G.** (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal.*, 9:1551–1558.
- Burboa**, Edgardo A., Ascacio-Valdés, Juan A., Zugasti-Cruz, Alejandro, Rodríguez-Herrera, Raúl, & Aguilar, Cristóbal N.. (2014). Capacidad antioxidante y antibacteriana de extractos de residuos de candelilla. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 45(1), 51-56.
- Cañipa A.** y Duran B. 1995. Reaprovechamiento del cefalotórax del camarón. *Industria Alimentaria*, 10-17
- Cárdenas G.**, Cabrera G., Taboada E. and Miranda S. (1993). Chitin characterization by SEM, FTIR, XDR and ¹³C cross polarization/mass angle spinning NMR. *Journal of Applied Polymer Science*, 1876-1885.
- Chen, X.**; Chen, R.; Guo, Z.; Li, C.; Li, P. (2007). The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin. *Food Chem.* 101, 1580–1584.
- Cordoba C.**, Acero R., Duque B., Jiménez A. y Serna J. (2015). Preparation and characterization of astaxanthin from microalgae *Haematococcus pluvialis*. Universidad La Gran Colombia, programa de ingeniería agroindustrial, 2015.
- Delgado A.**, Rufián H., Morales F.J. 2005. Assessing the Antioxidant Activity of Melanoidins from Coffee Brews by Different Antioxidant Methods. *J. Agric. Food Chem.* 53: 7832-7836.
- Dufresne, M. B.** Kellerhals and B. Witholt (1999). Trancrystallización in mcl-PHAs/cellulose whiskers composites. *Macromolecules*, 32(22), pp.7396-7401.

- Dupas C.**, Marsset B., Ordonaud C., Ducept F.M., Mailard M.N. 2006. Coffee Antioxidant Properties: Effects of Milk Addition and Processing Conditions. *J. Food Sci.* 71: S253-S258.
- Escobar D.**, Ossa C., Quintana M., (2013). Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. *Scientia et Technica*, 2260-266.
- Fan Y.**, Saito T., Isogai A. (2008a) “Chitin nanocrystals prepared by TEMPO-mediated oxidation of alpha-chitin”. *Biomacromolecules*, 9 (1)
- Fang Y.**, Duan B., Lu A., Liu M., Liu H, L., Xu X and Zhang L., (2015). Intermolecular Interaction and the Extended Wormlike Chain Conformation of Chitin in NaOH/Urea Aqueous Solution. *Biomacromolecules*. 16(4),1410-1417.
- Gip L.**, Abelin J. (1986) Differential Staining of Fungi in Clinical Specimens Using Fluorescent Whitening Agent (Blankophor). *Mycosen*; 30:21-24.
- Gopalan N.** and Dufresne A. (2003). Crab Shell chitin whisker reinforced natural rubber nanocomposites. Processing and swelling behavior. *Biomacromolecules*. 4(3):657-65.
- Guinesi, L.**, E.T.G. Cavalheiro (2006). The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. *Thermochimica acta*. 444, 128-133
- Higuera-Ciapara, I.**; Felix-Valenzuela, L.; Goycoolea, F.M.; Arguelles-Monal, W. (2004). Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydr. Polym.* 56, 41–45.
- Jang M.**, Kong B., Jeong Y., Lee C. and Nah J. (2004). Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin and γ -chitin separated from natural resources. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, 42(14), 3423-32.
- Jian-Bing Zeng**, Yi-Song He, Shao-Long Li, and Yu-Zhonh Wang (2012). Chitin Whiskers: An Overview”, *Biomacromolecules*, 13(1), 1-11.

- Kadokawa J.**, Takegawa A., Mine S. and Prasad K. (2011). Preparation of chitin nanowhiskers using an ionic liquid and their composite materials with poly(vinyl alcohol). *Carbohydrate polymers*. 84(4) 1408-1412.
- Köpsel C.**, Möltgen H., Schuch H., Auweter H., Kleinermanns K., Martin H. D. and Bettermann H. (2005). Structure investigations on assembled astaxanthin molecules. *Journal of Molecular Structure*. 750, 190-115.
- Lin, N.**, Huang, J., Chang, P. R., Feng, L., & Yu, J. (2011). Effect of polysaccharide nanocrystals on structure, properties, and drug release kinetics of alginate-based microspheres". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 85(2), 270–279.
- Medina J.**, Agraz A., Villagrán A. & Lozano M. (1992). Sistema Bentonita-Urea Adsorbida y su uso como acondicionador de suelos. SMCSV.
- Miki, W.** (1991). Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem*. 63 141–146.
- Min B.**, Lee J., Lim J., You Y., Lee T., Kang K. and Park W. (2004). Chitin and Chitosan nanofibers: Electrospinning of chitin and deacetylation of chitin nanofiber. *Polymer* 45(21), 7137-7142.
- Mincea, M.**, Negrulescu, A. and Ostafe V. (2012). Preparation, Modification, and Applications of Chitin Nanowhiskers: A Review. *Rev. Adv. Mater. Sci*. 30, 225-242.
- Naguib, Y. M. A.**, (2000). Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J. Agric. Food Chem.*48. 1150-1154.
- Olivas E.** y Alarcón L. (2004). Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos. Ciudad Juárez Chih.: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Departamento de Ciencias Básicas del ICB. Academia de Microbiología y Parasitología. Pág. 10.

- Osterlie, M.**, Bjerkgeng, B., and Liaaen-Jensen, S. (1999). Accumulation of astaxanthin all E, 9z and 13z geometrical isomers and 3 and 3_ optical isomers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is selective. *Journal of Nutrition*. 2:391–398.
- Renstrom, B.**, Borch, G., Skuiberger, O. M., and Liaaen-Jensen (1981). Optical purity of (3S,3'S)-astaxantina from *Haematococcus pluvialis*. *S. Phytochem*, 20:2561-2564
- Ribeiro, H. S.**; Rico, L.G.; Badolato, G.G.; Schubert, H. (2005). Production of O/W emulsions containing astaxanthin by repeated premix membrane emulsification. *J. Food Sci.* 70, E117–E123.
- Robielyn P.**, Ronald L., Timothy W., George N., Toma's P. and Harry A. (2005). Femtosecond Time-Resolved Absorption Spectroscopy of Astaxanthin in Solution and in α -Crustacyanin. *J. Phys. Chem.* 109, 3120-3127.
- Seabra, L. M.**, & Pedrosa, L. F. (2010). Astaxanthin: structural and functional aspects. *Revista de Nutrição da Puccamp*, 23(6), 1041-1050.
- Sweeney, J. P.**, & Marsh, A. C. (1973). Liver storage of vitamin A in rats fed carotene stereoisomers. *Journal of Nutrition*, 103, 20–25.
- Tachaprutinun, A.**, Udomsup, T., Luadthong, C., Wanichwecharungruang, S. (2009). Preventing the thermal degradation of astaxanthin through nanoencapsulation. *Int. J. Pharm.* 374, 119–124.
- Tharanathan, R. N.**, & Kittur, F. S. (2003). Chitin—The undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1), 61–87.
- Turujman, S. A.**, Wamer, W.G., and Wei, R.R. et al. (1997). Rapid liquid chromatographic method to distinguish wild salmon from aquacultured salmon fed synthetic astaxanthin. *Journal of AOAC International*., 3:622–632
- Uddin, A. J.**, Fujie, M., Sembo, S., & Gotoh, Y. (2012). Outstanding reinforcing effect of highly oriented chitin whiskers in PVA nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 799–805.

- Xuebo, L., & Toshihiko, O.** (2007). Cis astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-trans isomer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(1), 187–193.
- Yuan J. P., Peng J., Yin K and Wang J. H.,** (2011). Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. *Mol Nutr Food Res*. 55(1):150-65.
- Zeng, J. B., He Y. S. Li S. L., Wang Y. Z.** (2012). Chitin whiskers: an overview. *Biomacromolecules*. 13(1): 1-11.
- Zhang Y., Xue Y., Goa R. and Zhang X.** (2005). Determination of degree of deacetylation of chitin and chitosan by Xray diffraction. *Carbohydrate Reseach*, 1914-1917.
- Zhang, Y., Xue, C. and Xue, Y., Gao R. and Zhang, X.** (2005). Determination of Degree of Deacetylation of Chitin and Chitosan by X-ray Powder Diffraction. *Carbohydrate Research*. 340 (2005) 1914-7.