

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Química

Departament d'Enginyeria Química



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES

CIENTÍFICAS

Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona (IIQAB)

Departamento de Tecnología de Tensioactivos



NUEVOS TRATAMIENTOS DE LANA CON ENZIMAS

Susana Vilchez Maldonado

Barcelona, Octubre 2005

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LANA

1.1.1. Biología

La fibra de lana está compuesta mayoritariamente por queratina (82%). Las queratinas son unas proteínas muy especializadas producidas en ciertas células epiteliales de los vertebrados superiores que dependiendo de sus propiedades táctiles pueden clasificarse en duras o blandas. Un carácter distintivo de las queratinas duras es su elevado contenido en azufre, presente principalmente en los residuos del aminoácido cistina, como es el caso de la lana, pelo, cuernos, picos y plumas (Fraser y col., 1972).

Las fibras de lana se forman en folículos que son invaginaciones de la epidermis (**Figura 1.1.**). Los folículos son órganos dinámicos en los cuales tienen lugar varios procesos de forma simultánea: división y diferenciación celular, movimiento de las células que forman la fibra hacia la zona apical, biosíntesis de las proteínas de la lana, ensamblaje de las proteínas para formar estructuras supramoleculares y finalmente queratinización por la formación de enlaces disulfuro y puentes isopeptídicos.

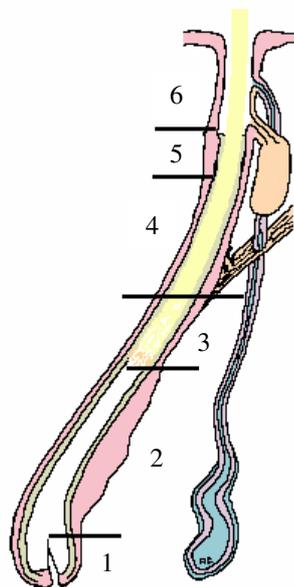


Figura 1.1. Esquema de un folículo de una fibra de lana (adaptado de Rouette, 2001).

Los diferentes estadios de desarrollo del crecimiento de la fibra de la lana en el folículo se pueden dividir en seis zonas. En la parte superior de la zona 1 tiene lugar la

formación de los filamentos intermedios de queratina, conocidos anteriormente como microfibrillas. Entre las zonas 1 y 2 los filamentos se agregan para formar macrofibrillas a las que se asocian unas proteínas ricas en azufre. En la zona 2 se forman agregados amorfos de proteína en las células cuticulares (diámetro alrededor de 30 μm). En las células ortocorticales se puede observar una estructura filamento-matriz. Al final de la zona 2 las células cuticulares están endurecidas mientras que la queratinización final tiene lugar en la zona 3 (Rouette, 2001).

1.1.2. Composición química

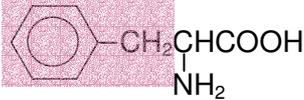
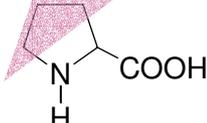
La lana no está compuesta solamente por queratina, sino también por otro tipo de proteínas denominadas no queratínicas, debido a su bajo contenido en cistina. Estas proteínas constituyen aproximadamente el 17 % de la fibra de lana. Además de proteínas, la fibra de lana contiene un 1 % de material no proteico como lípidos.

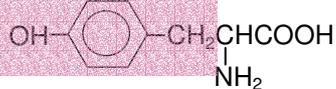
Las proteínas no queratínicas y los lípidos no se encuentran distribuidos de forma uniforme en la fibra de lana sino que su localización se concentra en zonas específicas (Rippon, 1992).

La hidrólisis completa de la lana con ácidos o álcalis produce una mezcla que contiene 18 aminoácidos (**Tabla D**). La composición de aminoácidos de la lana puede variar de forma significativa debido a causas genéticas, al estado fisiológico del animal y a la nutrición siendo el contenido en cistina particularmente susceptible a los cambios en la dieta (Rippon, 1992).

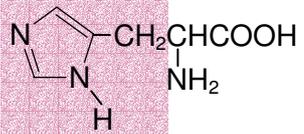
Como todas las proteínas, la lana contiene grupos aniónicos y catiónicos y por lo tanto es anfotérica. El carácter catiónico es debido a las cadenas laterales protonadas de la arginina, lisina, e histidina y a una pequeña cantidad de grupos amino libres que se encuentran al final de las cadenas peptídicas. El carácter aniónico se debe al ácido aspártico, glutámico y asparagina, así como también a los grupos carboxilos terminales. En su punto isoeléctrico a pH 4,2 el número de grupos aniónicos se corresponde con el número de grupos catiónicos y la fibra se encuentra en su forma más estable. El punto isoeléctrico es un factor muy importante en los procesos de lavado y acabado de la lana. Si el proceso de acabado consiste en la eliminación de un material, el proceso se facilita

Tabla I Aminoácidos presentes en la queratina clasificados según su naturaleza (adaptado de Rippon, 1992).

HIDROFÓBICA			
Aminoácido	Estructura	Aminoácido	Estructura
Glicina	$\begin{array}{c} \text{HCHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Leucina	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{CCHCH}_2\text{CHCOOH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH}_2 \end{array}$
Alanina	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Isoleucina	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{CCH}_2\text{CHCHCOOH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH}_2 \end{array}$
Fenilalanina		Triptófano	
Valina	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{CCHCHCOOH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Prolina	

HIDROXÍLICA	
Aminoácido	Estructura
Serina	$\begin{array}{c} \text{HOCH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Treonina	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{CCHCHCOOH} \\ \quad \\ \text{HO} \quad \text{NH}_2 \end{array}$
Tirosina	

AZUFRADA	
Aminoácido	Estructura
Metionina	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{CS}(\text{CH}_2)_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Cistina	$\begin{array}{c} \text{HOOCCHCH}_2\text{SSCH}_2\text{CHCOOH} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N} \quad \text{NH}_2 \end{array}$
Cisteína	$\begin{array}{c} \text{HOOCCHCH}_2\text{SH} \\ \\ \text{H}_2\text{N} \end{array}$

BÁSICA	
Aminoácido	Estructura
Arginina	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{NCNH}(\text{CH}_2)_3\text{CHCOOH} \\ \quad \\ \text{HN} \quad \text{NH}_2 \end{array}$
Lisina	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Histidina	

ÁCIDA	
Aminoácido	Estructura
Ácido Aspártico	$\begin{array}{c} \text{HOOCCH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Ácido Glutámico	$\begin{array}{c} \text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$

cuando la carga de la fibra y del material es la misma, ya que se repelen. En cambio la deposición de ciertos materiales de acabado sobre fibras o tejidos es mejor cuando las cargas de las fibras y del material son de signo contrario.

Las cadenas peptídicas de la queratina se forman por condensación de L- α -aminoácidos a través de sus grupos amino y carboxilo mediante la formación del enlace peptídico. Dichas cadenas peptídicas están unidas entre sí mediante uniones covalentes y no covalentes (**Figura 1.2**). Los enlaces que se establecen en la queratina pueden ser intracatenarios o intercatenarios. Los primeros intervienen en los fenómenos de elasticidad y alargamiento mientras que los intercatenarios contribuyen a estabilizar la estructura de la proteína y le proporcionan resistencia a la tracción.

Las uniones intra e intercatenarias pueden ser:

Covalentes

- Puentes disulfuro del aminoácido cistina: responsables de la elevada estabilidad y baja solubilidad de la queratina.
- Puentes isopeptídicos: formados entre el grupo ϵ -amino de la lisina y por los grupos β o γ -carboxílicos del ácido aspártico o glutámico.

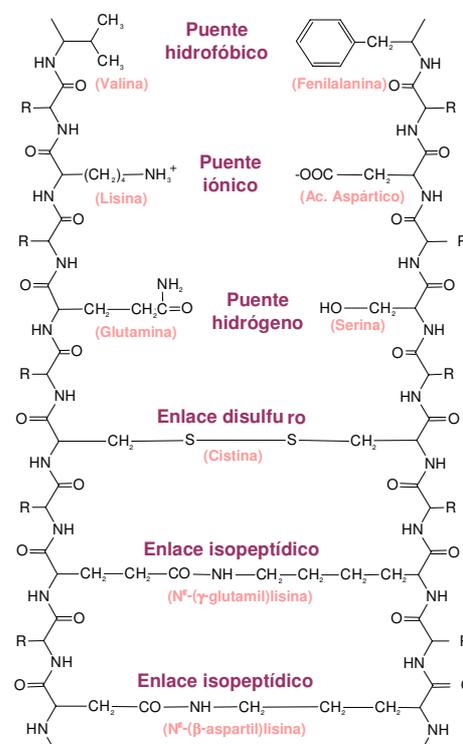


Figura 1.2. Estructura molecular de la queratina y tipos de enlace intercatenarios (adaptado de Rippon, 1992).

No covalentes

- Puentes de hidrógeno: interacciones que se establecen predominantemente entre los grupos -CO y -NH de las cadenas peptídicas.
- Enlaces iónicos: interacciones entre grupos con carga contraria.
- Enlaces hidrofóbicos: interacciones entre grupos lipófilos de los aminoácidos cuando están en un medio acuoso. Dichos enlaces estabilizan la agregación de las cadenas laterales no polares, reduciendo así el área de contacto con el agua.

La lana puede ser hidrolizada por ácidos y también por álcalis. La hidrólisis completa de la lana con ácidos se puede realizar con ácido clorhídrico a una concentración 6 M a 105-110°C durante 24 horas. Bajo estas condiciones la mayoría de los aminoácidos son liberados, excepto el triptófano que sufre una destrucción completa (Maclaren y Milligan, 1981). La lana también puede ser hidrolizada de forma parcial por ácidos. Durante el tratamiento de proteínas con ácido tiene lugar la ruptura de los enlaces peptídicos e isopeptídicos laterales. La sensibilidad de la lana a la hidrólisis ácida se incrementa si la cistina es transformada previamente en ácido cisteico por oxidación (Maclaren y Milligan, 1981).

Todas las proteínas son susceptibles al ataque por álcalis, debido a la hidrólisis de los enlaces peptídicos. Las proteínas que contienen cistina son especialmente sensibles debido a la reacción de los enlaces disulfuro con el álcali (Maclaren y Milligan, 1981). Horn y colaboradores fueron los primeros en identificar el aminoácido lantionina, que aislaron a partir de un hidrolizado de lana tratada con álcali. La lantionina es uno de los productos principales de la degradación alcalina, un aminoácido similar a la cistina que presenta un átomo de azufre unido a dos átomos de carbono. El mecanismo de formación de lantionina más plausible a partir de cistina es el ataque al carbono β (**Figura 1.3**). En 1964 otro nuevo aminoácido, N^ε-(2-amino-2-carboxietil) lisina, llamado lisinoalanina fue aislado a partir de proteínas tratadas con álcali. Los residuos de lisinoalanina se forman cuando péptidos que contienen residuos de cisteína (o cistina) y lisina son tratados con álcali. Péptidos que contienen residuos de serina y lisina también forman residuos de lisinoalanina (Maclaren y Milligan, 1981). En general, un incremento en el pH, temperatura o tiempo de tratamiento de la lana provoca una disminución en el contenido de cistina y azufre y un incremento en lantionina y lisinoalanina. Sin embargo, durante tratamientos prolongados bajo condiciones severas

el contenido en lantionina alcanza un máximo y posteriormente disminuye, debido probablemente a la lenta destrucción de los residuos de lantionina por el álcali.

La influencia que tienen los residuos de lantionina y lisinoalanina en las propiedades mecánicas y físico-mecánicas de la lana tratada con álcali depende en gran parte de si los residuos forman enlaces inter- o intracatenarios.

Un método para determinar el daño que ha sufrido la fibra tras los distintos tratamientos a los que ha sido sometida es el test de solubilidad en urea bisulfito. Cuando la lana ha sido tratada con álcali tiene lugar una disminución en la solubilidad en urea bisulfito debido a la formación de entrecruzamientos vía lantionina y lisinoalanina (**Figura 1.3.**). Sin embargo, cuando el tratamiento es con ácido la solubilidad en urea bisulfito tiende a aumentar debido a la hidrólisis de enlaces peptídicos.

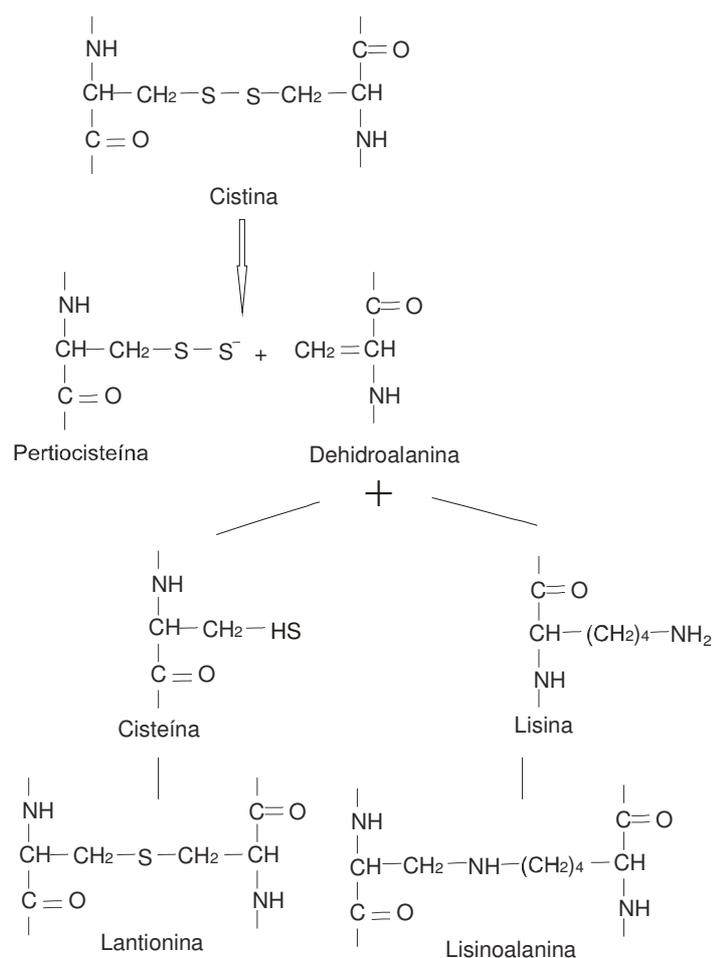


Figura 1.3. Formación de lantionina y lisinoalanina al tratar la lana con una solución alcalina (adaptado de Maclaren y Milligan, 1981b).

1.1.3. Morfología de la fibra

La fibra de lana está formada por dos tipos de células: las células cuticulares que forman la capa externa (cutícula) y las células corticales que forman la zona interna (córtez) y están unidas entre sí por el complejo membranoso celular (CMC) (**Figura 1.4.**). Además en las fibras gruesas existe una estructura central denominada médula, constituida por células poliédricas dispuestas de forma axial a lo largo de la fibra.

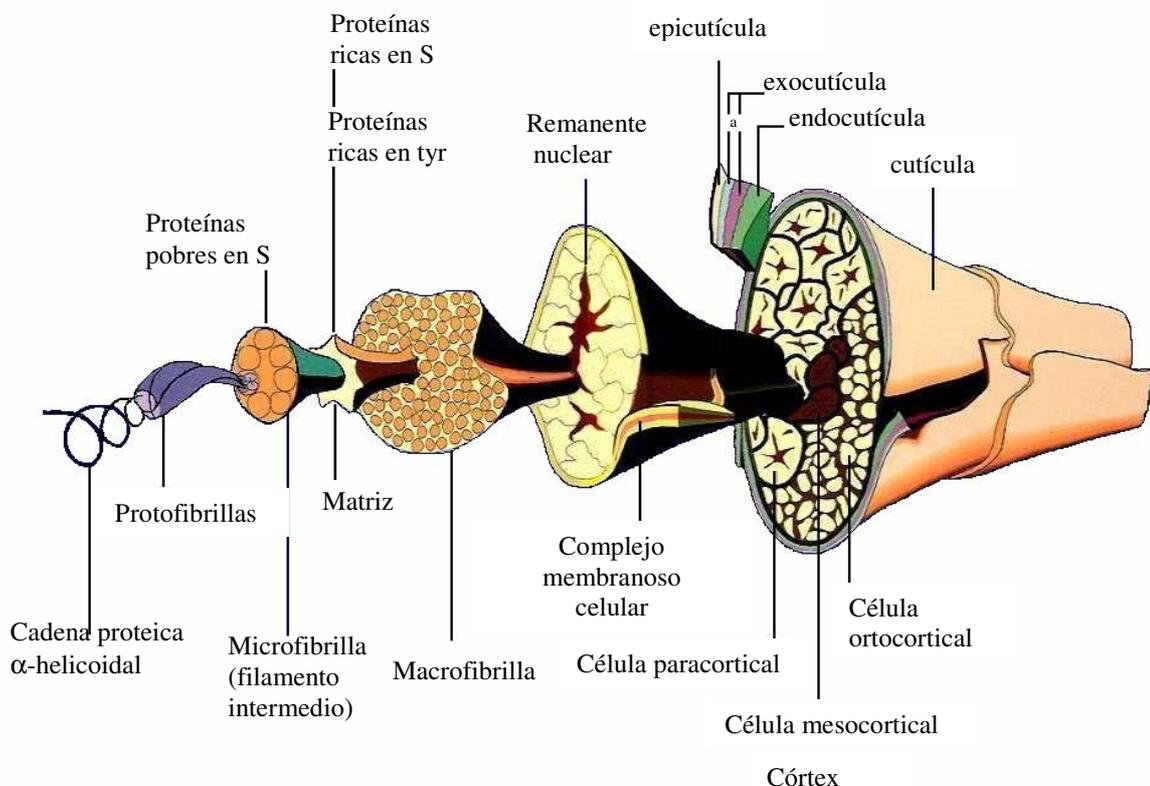


Figura 1.4. Estructura morfológica de la fibra de lana (adaptado de Feughelman, 1997).

Cutícula

La cutícula está formada por células laminares de contorno poligonal parcialmente superpuestas unas sobre otras en el sentido de la raíz a la punta. Cada célula cuticular consta de: epicutícula, exocutícula y endocutícula (**Figura 1.5.**). La cutícula constituye el 10% del total de la fibra y su grosor oscila entre 1 y 2 μm (Rippon, 1992) siendo responsable de propiedades como la humectabilidad y propiedades táctiles de la lana.

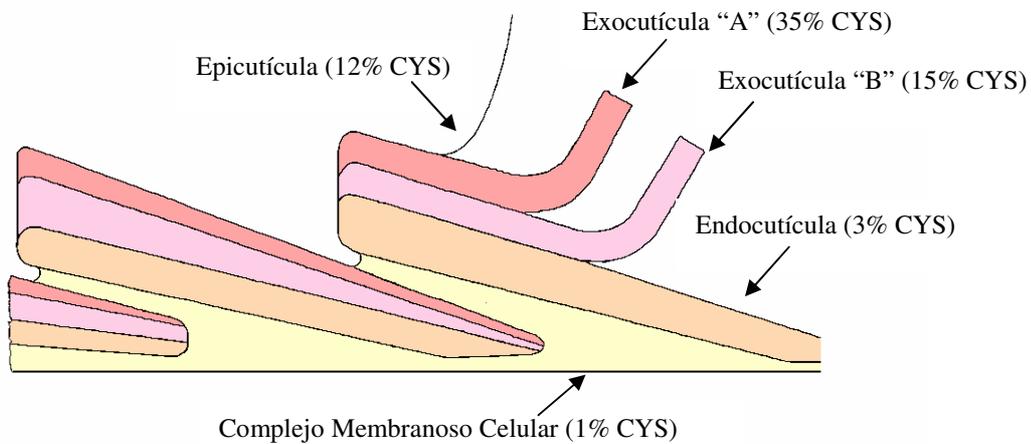


Figura 1.5. Esquema de la cutícula de una fibra de lana (adaptado de Rippon, 1992).

Epicutícula

La epicutícula es la capa más externa de la fibra y su espesor es de 50-100 Å (Rippon, 1992). Está formada por tres cuartas partes de proteína y una cuarta parte de lípidos (Negri y col., 1993a). Es muy resistente al ataque químico en comparación con el resto de la fibra. Según Negri y colaboradores (Negri y col., 1993a), la epicutícula tiene un espesor de 5-7 nm y está compuesta químicamente por una monocapa lipídica (F-layer) en la que predomina el ácido 18-metileicosanoico (65%) de aproximadamente 2,5- 3,0 nm de longitud y una capa proteica con grupos hidrofílicos (**Figura 1.6.**). Los ácidos grasos están unidos covalentemente a la capa proteica vía enlace éster o tioéster y sus cadenas hidrocarbonadas están orientadas hacia el exterior de la fibra confiriendo hidrofobicidad y resistencia a la epicutícula, frente a ataques con distintos agentes (Negri y col., 1993b; Leeder y Rippon, 1985). Esta es la razón por la cual la lana tiene una superficie hidrofóbica que repele el agua incluso tras la eliminación de la grasa mediante lavado acuoso o extracción con disolventes. La hidrofobicidad de la superficie de la lana se puede reducir mediante distintos tratamientos como la cloración o el tratamiento con plasma de baja temperatura (Molina, 2002). Recientemente nuestro grupo ha evidenciado que la naturaleza hidrofóbica de la epicutícula tiene una influencia directa en el proceso de encogimiento de la lana. Pues análisis de microscopía de fuerza atómica muestran que la rugosidad de la fibra y la altura de la escama no cambian

debido al tratamiento con plasma, pero al incrementar la hidrofilia de las fibras, la resistencia al encogimiento aumenta. La monocapa lipídica puede incorporar en sus cadenas hidrocarbonadas grupo hidrófilos por un proceso de oxidación mediante tratamiento con plasma o ser completamente eliminada dando lugar a un aumento en la hidrofilia de la fibra. Ello puede mejorar la adhesión de polímeros, como en el caso del quitosano que se favorece su adsorción sobre los tejidos de lana tratados con plasma como consecuencia de la formación de grupos polares que interaccionarían con los grupos amino e hidroxilo del quitosano (Molina, 2002).

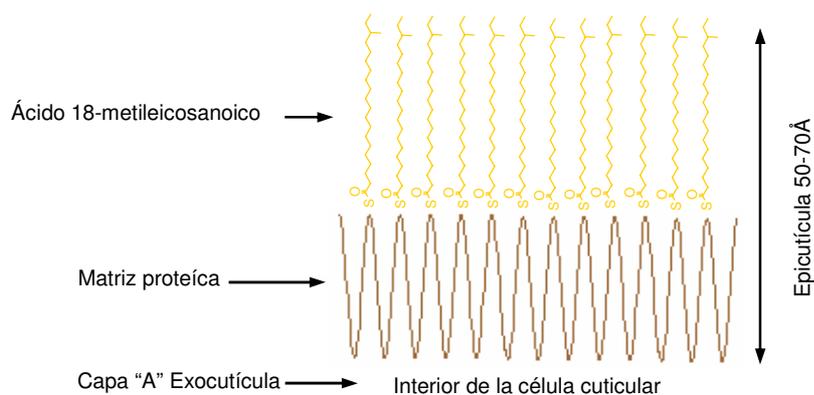


Figura 1.6. Modelo de las fibras queratínicas (adaptado de Negri y col., 1993b).

Exocutícula

Es una capa proteica situada bajo la epicutícula. Se pueden diferenciar dos zonas la capa A situada en la parte exterior de la exocutícula con un alto contenido en cistina (35%) y la B en la parte interior y con un contenido inferior de este aminoácido (15%) (Negri y col., 1993b). La capa A debido a su elevado contenido en enlaces disulfuro posee carácter hidrofóbico y constituye una auténtica barrera para la difusión de ciertos compuestos (Leeder, 1986), de entre ellos los enzimas.

Endocutícula

Está situada debajo de la exocutícula y rodeada por el complejo membranoso celular que la separa de otras células cuticulares o de células corticales. Presenta una baja densidad de enlaces disulfuro (3%) a diferencia de la exocutícula motivo por el cual es más susceptible ante el ataque químico y enzimático que la exocutícula (Negri, 1993b).

La estructura escamosa de la cutícula es la responsable de la diferencia de fricción entre las direcciones pro-escama y contra-escama que presentan las fibras de lana (**Figura 1.7.**). Este efecto de fricción direccional está asociado al encogimiento que presentan las fibras de lana durante el lavado acuoso con agitación (Canal y col., 2005).

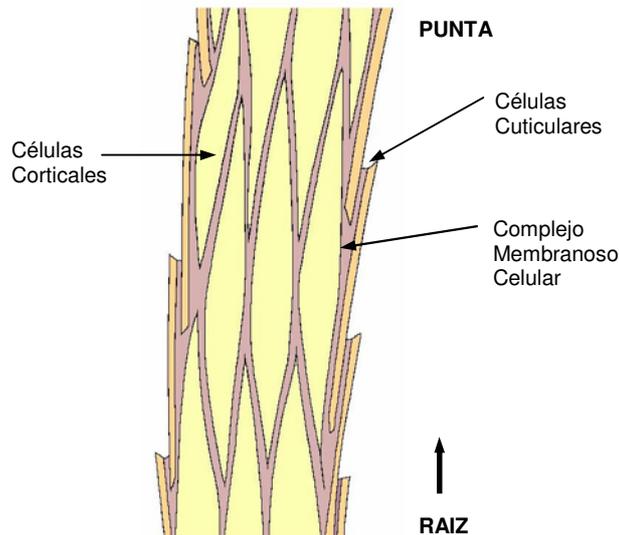


Figura 1.7. Esquema general de una fibra de lana (adaptado de Feughelman, 1997).

Córtex

Es el componente principal de la fibra de lana ya que constituye el 90 % del total de la fibra. El córtex está formado por células corticales en forma de huso cuyas dimensiones son 100 μm de longitud y 4 μm de anchura. Estas células son las responsables de la resistencia, elasticidad y de las propiedades tintóreas de la lana.

El córtex se diferencia en dos partes: ortocórtex y paracórtex (**Figura 1.8.**). El ortocórtex se localiza en la zona exterior de la ondulación de la fibra de lana y el paracórtex en la interior de la misma. El contenido del aminoácido cistina es mayor en el paracórtex siendo químicamente más estable, debido a su elevado grado de entrecruzamiento, que el ortocórtex. Cada célula cortical contiene alrededor de 5-8 macrofibrillas y matriz intermacrofibrilar compuesta por restos de citoplasma y núcleo celular de los queratinocitos. Una macrofibrilla es un haz de 500-800 microfibrillas que son filamentos intermedios de queratina (KIF), los cuales pertenecen a la familia de las proteínas filamentosas intermedias. La denominación de filamento intermedio se debe a que su diámetro de 7-11 nm se encuentra entre el de los microfilamentos y

microtúbulos, ambos, junto con los filamentos intermedios constituyen el citoesqueleto de casi todas las células eucariotas. Los filamentos intermedios están formados por cuatro protofibrillas que a su vez están formadas por dos protofilamentos. Cuatro moléculas KIF forman un protofilamento cuyo diámetro es 2,8 nm. La estructura primaria de estas moléculas KIF está caracterizada por los dominios N-terminal y C-terminal ricos en cistina y prolina que flanquean un dominio central formado por 4 segmentos α -helicoidales (1A, 1B, 2A y 2B) separados por los segmentos L1, L12 y L2 (**Figura 1.9.**). Los aminoácidos en los segmentos helicoidales están organizados en héptadas. Dos proteínas KIF, una de naturaleza ácida y la otra básica, forman el dímero, un heterodímero. El efecto hidrofóbico es el principal responsable de la formación del dímero pero también intervienen fuerzas Coulombicas en su estabilización.

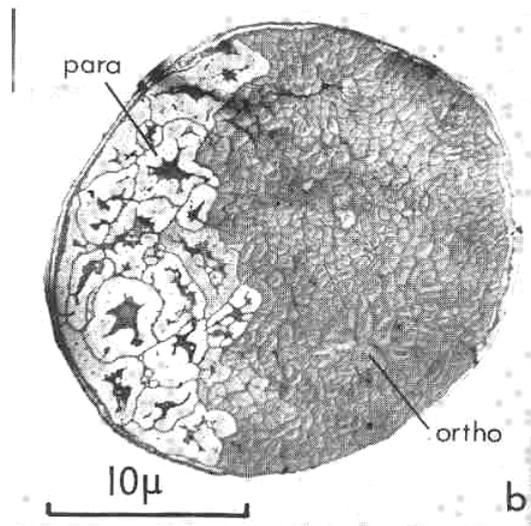


Figura 1.8. Fotografía de microscopía electrónica de un corte transversal de una fibra de lana Merino (Fraser y col., 1959).

En el córtex están presentes proteínas con bajo y alto contenido en azufre y proteínas ricas en glicina y tirosina. En la matriz encontramos proteínas con elevado contenido en azufre y proteínas ricas en glicina y tirosina (Feughelman, 1997), mientras que los filamentos intermedios son relativamente ricos en proteínas con bajo contenido en azufre.

Las células paracorticales presentan un elevado contenido en matriz y por lo tanto una elevada proporción de proteínas ricas en azufre mientras que las células ortocorticales contienen una gran cantidad de filamentos intermedios y proteínas con

bajo contenido en azufre que favorecen la formación de las hélices α . El ortocórtex presenta una matriz que se hincha con más facilidad que la del paracórtex debido a que presenta menos entrecruzamientos.

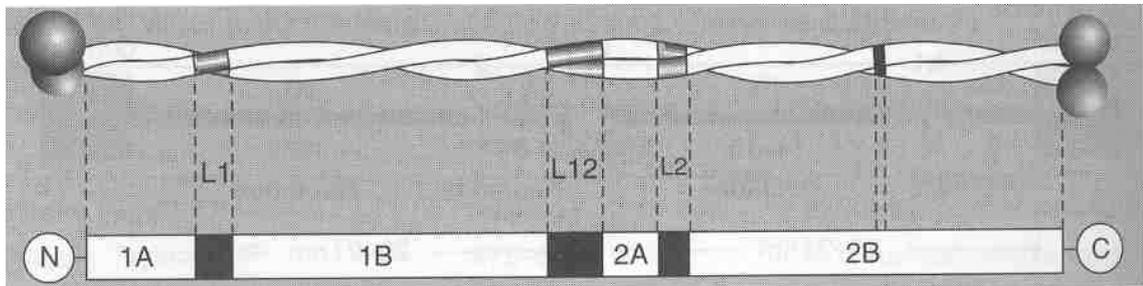


Figura 1.9. Representación esquemática de un heterodímero (Höcker, 2002)

El diferente contenido en cistina de las células ortocorticales y paracorticales puede ser el responsable de la endoterma de fusión bimodal que muestra a menudo la lana Merino. Los dos picos que se observan han sido asignados a la fusión diferencial de las células ortocorticales y paracorticales (Wortmann y Deutz, 1998; Haly y Snaith, 1967) o a la fusión y posterior degradación de la matriz (Cao, 1997; Spei y Holzem, 1987).

Wortmann y Deutz (Wortmann y Deutz, 1998) mostraron que cuando se realizaba un análisis térmico de fibras de lana Merino se observaba una endoterma de desnaturalización bimodal con picos separados entre sí 4-6°C y asignaron los dos picos la presencia de células ortocorticales y paracorticales. Debido al elevado contenido en enlaces disulfuro en las células paracorticales, la temperatura de desnaturalización es más elevada que en las células ortocorticales.

Complejo membranoso celular

Las células cuticulares están separadas entre sí y de las células corticales por un complejo membranoso celular (CMC), el cual rodea las células corticales, constituyendo, por tanto, la fase continua de la fibra (**Figura 1.10.**). El CMC tiene un grosor aproximado de 25 nm en la lana merino y su función consiste en la adhesión de las células. La fibra puede disgregarse en células individuales atacando el complejo membranoso celular con enzimas o ácido fórmico.

Observaciones en estados diferentes de formación de la fibra de lana han mostrado que el CMC se forma en el folículo a partir de dos membranas plasmáticas de células

vivas adyacentes. El CMC constituye el 6% (sobre peso de lana) del total de la fibra y está compuesto por cemento intercelular (3%), componente lipídico (1,5%) y membranas resistentes (1,5%). También se han identificado componentes minoritarios como carbohidratos azúcares y residuos de conectina. (Leeder, 1986).

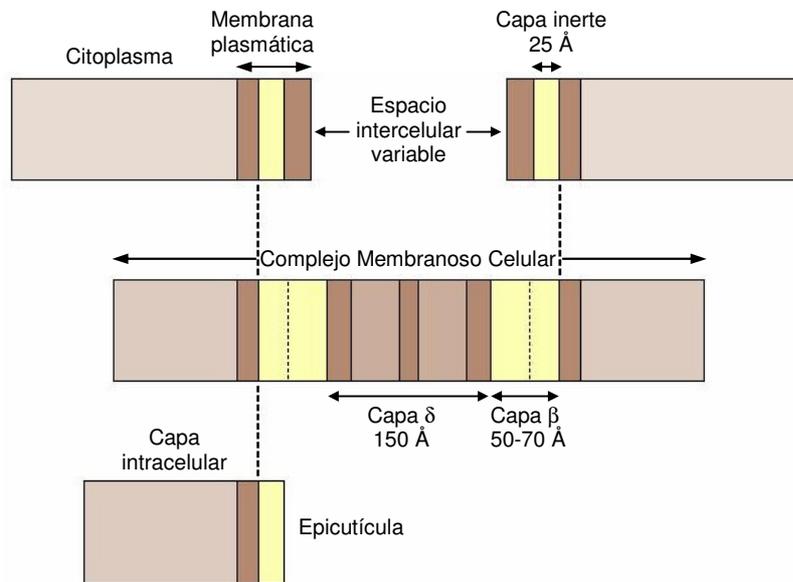


Figura 1.10. Esquema de la estructura del complejo membranoso celular (adaptado de Leeder, 1986).

El cemento intercelular está compuesto por lípidos y proteínas no queratínicas que une las células de las fibras de queratina. Durante el proceso de queratinización las membranas se modifican y el cemento intercelular se dispone entre las células proporcionándoles adhesión intercelular. Este cemento intercelular presenta diferente composición química entre cutícula-cutícula, cutícula-córtex y córtex-córtex (Nakamura y col., 1985). Contiene niveles muy bajos de cistina y niveles altos de glicina, tirosina y fenilalanina. Debido a su bajo contenido en enlaces disulfuro esta región se hincha con facilidad y por el mismo motivo se le ha denominado no queratínico (junto con la endocutícula, material intermacrofibrilar y el núcleo celular) para distinguirlo del principal componente queratínico de la fibra. Constituye un enlace químico y mecánico débil de la fibra. Por este motivo debe jugar un papel importante en el comportamiento físico y químico de la fibra.

El componente lipídico o los lípidos internos consisten principalmente en ácidos grasos libres, colesterol, triglicéridos, y otros ésteres de ceras. Sorprendentemente, la

mayoría de los análisis muestran pequeñas cantidades de fosfolípidos, lo cual sugiere que no es un componente importante del CMC, contrariamente a la elevada proporción de fosfolípidos que se encuentran en la membrana plasmática de las células. Por lo tanto se supone que los fosfolípidos tienden a desaparecer de las regiones intercelulares durante la queratinización.

Las membranas resistentes son denominadas así porque no se disuelven o tardan mucho tiempo en hacerlo cuando las fibras se exponen a la acción de agentes queratinolíticos como ácidos, álcalis, agentes reductores o enzimas proteolíticos. Contienen aproximadamente la misma proporción de enlaces cistina que la fibra en su conjunto. La razón por la cual es tan inerte se desconoce. Presenta un elevado contenido en lisina y esto sugiere que se pueden formar enlaces isopeptídicos entre la lisina y el ácido glutámico, contribuyendo a la estabilidad química (Leeder, 1986).

A pesar de que el CMC tan solo constituye alrededor del 6% de la fibra de lana tiene una gran influencia en las propiedades de la fibra y consecuentemente del tejido. Se ha sugerido que los componentes del CMC pueden afectar a las propiedades mecánicas como resistencia a la abrasión y resistencia a la fatiga torsional; a las propiedades químicas como susceptibilidad al ataque por ácidos, enzimas proteolíticos y agentes químicos de acabado; al comportamiento de la difusión de los colorantes y otras moléculas en el interior de la fibra.

1.1.4. Encogimiento

Uno de los principales problemas que presenta la lana para su uso como prenda de fácil lavado es que se encoge durante un lavado acuoso con agitación. En el encogimiento tienen lugar tres fenómenos: expansión higral, relajación y fieltrado.

- Expansión higral: modificación reversible de las dimensiones de los hilos y tejidos debido a la humedad relativa del ambiente. En las fibras de lana, al aumentar la humedad, aumenta el contenido de agua de las fibras, incrementándose consecuentemente sus dimensiones superficiales. La expansión higral ha sido estudiada por varios autores que han mostrado que es debida a cambios en la curvatura de la fibra (Cednäs, 1961; Baird, 1962; Baird, 1967; Kopke, 1972).
- Encogimiento por relajación: es un proceso que tiene lugar la primera vez que se introducen hilos o tejidos en solución acuosa o se exponen a humedad relativa

elevada, y consiste en una contracción longitudinal irreversible. Es causado por la tensión a la que han estado sometidas las fibras durante los procesos de hilatura y tejeduría.

- Encogimiento por fieltrado: únicamente tiene lugar en las fibras de lana y otras fibras animales y es de carácter irreversible y progresivo.

Fieltrado

Es un proceso de compactación y enmarañamiento de fibras que tiene lugar bajo agitación mecánica, fricción y presión en presencia de calor y humedad. Este proceso es totalmente irreversible y se atribuye principalmente a la estructura escamosa de las fibras de lana aunque en estudios realizados recientemente por nuestro grupo se ha observado que la hidrofobicidad de las fibras juega un papel importante (Molina, 2002). Las escamas forman una estructura tipo rastrillo que origina un efecto de fricción direccional (Feughelman, 1997) que tradicionalmente se ha considerado el causante del encogimiento de los tejidos de lana. Otras fuentes (Makinson, 1975) atribuyen el encogimiento por fricción de las fibras en dirección contra escama a parámetros de adhesión (fuerzas de Van der Waals) y de deformación, además de al efecto principal de anclaje atribuido a la geometría de las fibras.

Tratamientos para conferir inencogibilidad a la lana

Se han estudiado diferentes tratamientos para reducir el fieltrado de las fibras. La mayoría de estos tratamientos modifican la superficie de la fibra mediante ataque químico reduciendo o eliminando la diferencia friccional entre la raíz-punta y punta-raíz. Los tratamientos antiencogimiento consisten en el suavizado o recubrimiento de las escamas o en su eliminación parcial.

Existen distintos métodos para conferir a la lana resistencia al encogimiento pero el más utilizado industrialmente sigue siendo el de cloración-Hercosett. Consiste en un tratamiento con cloro, con el fin de reducir la tensión superficial crítica de la fibra de lana, seguido de una polimerización de una resina catiónica poliamida-epiclorhidrina, denominada comercialmente Hercosett 57. El efecto de antiencogimiento se atribuye a la unión de una película de agua alrededor de la fibra a través del polímero que se ha depositado sobre la fibra, enmascarando las escamas y evitando la atracción de las fibras (Rouette, 2001). El proceso cloración-Hercosett produce compuestos orgánicos

halogenados absorbibles (AOX), altamente contaminantes y por este motivo actualmente se investigan métodos alternativos que respeten el medio ambiente como los basados en tratamientos enzimáticos (Levene y col., 1996; Mangovska, B. y Prendzova, 2000; Jovancic y col., 2000; Schumacher y col., 2001; Sawada y Ueda, 2001; Schroeder y col., 2004; Cortez y col., 2004; Vílchez y col., 2005) en procesos físico-químicos menos agresivos como el tratamiento con plasma de baja temperatura (Byrne y Godau, 1995; Hesse y col., 1995; Kan y col., 1998; Erra y col., 1999b). Ambos métodos incrementan en diferente grado la resistencia al encogimiento de la lana, aumentan el grado de blanco y, además, mejoran la tintura de la fibra.

Respecto a los tratamientos enzimáticos, los enzimas objeto de estudio han sido principalmente proteasas y lipasas. Las proteasas se pueden utilizar para eliminar parcialmente la cutícula (El-Sayed y col., 2001; Heine y Höcker, 1995) o suavizar las escamas de las fibras. Sin embargo, la hidrólisis parcial de las fibras de lana por proteasas puede provocar pérdida de peso y de resistencia de la fibra (Bishop y col., 1998; Riva y col., 1993; Shen y col., 1999). Como las proteasas son generalmente enzimas de pequeño tamaño, pueden penetrar fácilmente hacia el interior de la fibra y destruir el córtex, reduciendo la resistencia de la fibra. Por lo tanto se debería restringir la actividad enzimática a la superficie a fin de controlar su difusión hacia el córtex. Con el fin de cambiar el comportamiento de difusión de las proteasas hacia el interior de la fibra, Schroeder y colaboradores (Schroeder y col., 2004) estudiaron unir de forma covalente el polímero polietilenglicol (PEG) a una proteasa de *Bacillus lentus*. La finalidad de este estudio era aumentar el peso molecular del enzima para dificultar su acceso hacia el interior de la fibra. Demostraron que se podía obtener una moderada mejoría en el encogimiento de la lana mediante el pretratamiento enzimático sin un excesivo dañado del tejido. Otro método utilizado para incrementar el peso molecular de enzimas fue el entrecruzamiento con glutaraldehído (Silva y col., 2004). Se observó que el número de residuos libres de lisina era un factor clave para que el glutaraldehído pudiera reaccionar con las proteínas y aumentar así su peso molecular. Obtuvieron un incremento en el peso molecular de caseína y albúmina bovina, sin embargo, con el enzima esperase no se produjo el aumento en el peso molecular debido, probablemente, a la escasa cantidad de residuos libres de lisina.

1.2 QUITOSANO

El quitosano es un polisacárido natural obtenido por desacetilación de la quitina. La quitina fue aislada por primera vez en 1811, a partir de hongos superiores, por Braconnot, quien le asignó el nombre de fungina. En 1823, Odier aisló, a partir de escarabajos, un complejo insoluble al que denominó quitina, un vocablo que proviene del griego “χιτωμαγ” y que significa cubierta o envoltura. En 1859, Rouget observó que tratando quitina con hidróxido de sodio concentrado obtenía un nuevo producto al que denominó “quitina modificada” y que era soluble en ácidos orgánicos. Pero no es hasta 1894 cuando Hoppe-Seyler sometió la quitina a reflujo a 180°C en hidróxido de potasio y observó que el producto que se formaba era bastante soluble en ácido acético y clorhídrico y lo denominó quitosano (Pastor e Higuera, 2004).

La reacción de desacetilación, o sea, la pérdida del grupo acetilo del grupo amida del carbono 2 dando lugar a un grupo amino en esa posición se produce cuando la quitina se somete a la acción de un medio alcalino muy concentrado y a temperaturas superiores a 60°C.

El quitosano está constituido por residuos 2-acetoamido-2-deoxi-β-D-glucopiranososa (GlcNAc) y 2-amino-2-deoxi-β-D-glucopiranososa (GlcN) unidos por enlaces glucosídicos β(1-4) (**Figura 1.11.**).

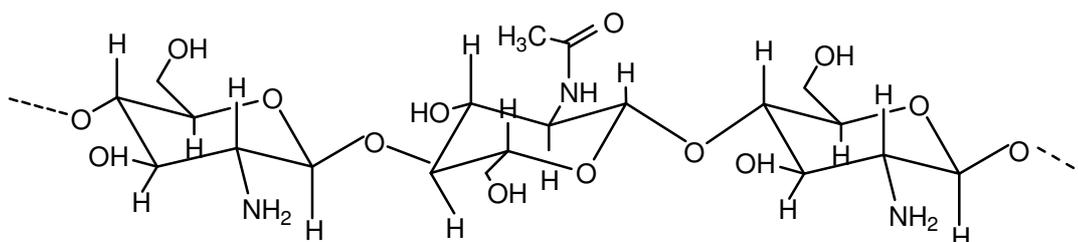


Figura 1.11. Estructura química del quitosano.

1.2.1. Fuentes y métodos de obtención del quitosano

La quitina es el polímero natural más abundante después de la celulosa. Está presente en la pared celular de los hongos, levaduras, y en el exoesqueleto de los invertebrados como cangrejos, gambas e insectos. La principal fuente de obtención de la quitina son los desechos de los crustáceos, compuestos por proporciones variables de

proteínas, sales de calcio, quitina y pequeñas cantidades de grasa y pigmentos. El aislamiento de quitina requiere tres operaciones básicas:

- Desproteínezación: separación de la proteína
- Desmineralización: eliminación de la materia inorgánica
- Decoloración: separación de los pigmentos lipídicos (carotenoides)

Una vez se ha extraído la quitina se debe proceder a la obtención del quitosano por un proceso de desacetilación que puede ser químico o enzimático.

Desproteínezación

La desproteínezación puede ser química o enzimática. En el proceso químico los exoesqueletos de los crustáceos son tratados, normalmente, con soluciones de NaOH (1-10%) a temperaturas entre los 65 y 100°C durante un periodo de 1 a 24 horas.

El proceso enzimático consiste en la digestión enzimática o fermentación con bacterias proteolíticas con actividad no quitinolítica, por ejemplo, *Pseudomonas maltophila*. Este proceso presenta la ventaja de que disminuye la degradación química de la quitina y además es respetuoso con el medio ambiente, sin embargo no se consigue la eliminación de toda la proteína.

Desmineralización

El contenido mineral de los residuos de los crustáceos oscila entre 30% y 50% y está constituido, principalmente, por carbonato de calcio y en menor proporción por fosfato de calcio. La eliminación del carbonato de calcio se realiza por tratamiento ácido con soluciones diluidas de HCl, aunque también se han utilizado otros ácidos como H₂SO₃, HNO₃, CH₃COOH, HCOOH.

Decoloración

Los exoesqueletos de crustáceos contienen pigmentos que pueden ser recuperados ya que poseen un alto valor comercial. La mayor parte de los pigmentos presentes son astacina, astaxantina, cantaxantina, luteína y el β-caroteno. Tras la desmineralización con tratamientos ácidos estos pigmentos pueden ser separados mediante extracciones con etanol, éter, acetona y cloroformo. El empleo de ácido acético al 50% en caliente puede desmineralizar las cáscaras y extraer los carotenoides al mismo tiempo. Otra

opción para realizar la decoloración sería emplear agentes blanqueadores como H_2O_2 al 0,5-3% o NaClO al 0,32%.

Obtención del quitosano

La obtención del quitosano se produce por desacetilación de la quitina y se puede realizar mediante procesos químicos o enzimáticos. El proceso químico se puede llevar a cabo de dos formas, homogénea y heterogénea. La desacetilación homogénea comienza con un pretratamiento de hinchamiento y la eventual disolución completa de la quitina en frío ($\sim 0^\circ C$) mediante la utilización de una relación de quitina a NaOH (p/p) de 1:10. Luego se somete a desacetilación a temperaturas cercanas a la del ambiente durante períodos largos de tiempo. Esto permite que la reacción no se localice en determinados lugares de la cadena (Goycoolea y col., 2004) y que el ataque a los grupos amida sea más uniforme. La desacetilación heterogénea, en algunos casos, se lleva a cabo en soluciones acuosas concentradas de bases como hidróxido de sodio o de potasio, bajo condiciones severas ($100-160^\circ C$). Las condiciones en las que se lleva a cabo la desacetilación heterogénea pueden reducir la longitud de la cadena por este motivo es conveniente repetir varias veces el tratamiento alcalino por cortos periodos de tiempo y aislando el producto en cada etapa (Mima y col., 1983). Para disminuir la pérdida de peso molecular del polímero es conveniente la ausencia de oxígeno o la presencia de un antioxidante (Domard y Rinaudo, 1983).

Otro método para obtener quitosano es la utilización de enzimas. La principal ventaja de este método respecto al químico es la obtención de un material uniforme en sus propiedades físicas y químicas, hecho muy apreciado para aplicaciones biomédicas. La quitina desacetilasa es el enzima que cataliza la conversión de quitina a quitosano por la desacetilación de los residuos N-acetil-D-glucosamina. La limitación de este método es que el enzima no es muy efectivo en la desacetilación de quitina insoluble y por lo tanto es necesario un pretratamiento.

1.2.2. Caracterización físico-química

Tanto la composición de las cadenas de quitosano, como sus dimensiones, suelen variar dependiendo del material de partida y de la rigurosidad del método de obtención. Por este motivo, el grado de desacetilación y el peso molecular son dos parámetros que

se deben conocer para caracterizar una muestra de este polisacárido ya que ambos tienen gran incidencia en sus propiedades. Otros parámetros a determinar para su caracterización más completa serían, el porcentaje de humedad, el contenido de cenizas, las proteínas totales, la cristalinidad, la determinación del contenido de material insoluble, etc.

1.2.2.1. Determinación del grado de acetilación

El grado de acetilación se define como el contenido en residuos N-acetilglucosamina (GlcNAc) presentes en la cadena polimérica. Existen numerosos métodos para determinar el grado de N-acetilación del quitosano basado en diversas técnicas. Entre estas técnicas podemos destacar la espectroscopia de infrarrojo (Sannan y col. 1978; Moore y Roberts, 1980; Baxter y col., 1992; Brugnerotto y col., 2001;), la espectroscopia de UV (Muzzarelli y Rocchetti, 1985; Muzzarelli y col., 1997) la espectroscopia de RMN (Inoue, 1997; Ebert y Fink, 1997), la potenciometría (Muzzarelli, 1977) y la conductimetría (Raymond y col., 1993).

El grado de acetilación, normalmente, se designa con las siglas DA (degree acetylation), aunque también se le puede encontrar como F_A (fracción molar de residuos GlcNAc) o como grado de desacetilación DD (deacetylation degree).

$$DA = \frac{[GlcNAc]}{[GlcNAc + GlcN]} \times 100 \quad \text{Ecuación 1.1.}$$

siendo,

$GlcN$: glucosamina

$GlcNAc$: N-acetilglucosamina

Espectroscopia infrarroja

Es uno de los métodos más empleados ya que es muy sencillo. Las muestras se pueden preparar en forma de películas o en pastillas de KBr. Este método consiste en correlacionar la intensidad de absorbancias entre dos bandas de absorción determinadas con el porcentaje de acetilación del quitosano. La selección de las bandas involucra normalmente una de las bandas amida (I o III) y otra banda que sirve de referencia

interna para corregir las diferencias de grosor de las películas o de concentración en las pastillas de KBr.

Brugnerotto y col. (Brugnerotto y col., 2001) tomaron como banda característica la amida III localizada a 1320 cm^{-1} y como referencia la banda de los grupos metilos a 1420 cm^{-1} y obtuvieron una correlación lineal que viene expresada por la Ecuación 1.2.. En cambio, Baxter y col. (Baxter y col., 1992) tomaron como banda característica la amida I localizada a 1655 cm^{-1} y como referencia la banda de grupos hidroxilos a 3450 cm^{-1} y obtuvieron la siguiente correlación lineal (Ecuación 1.3.).

$$DA(\%) = 31,92 \times (A_{1320} / A_{1420}) - 12,20 \quad r=0,990 \quad \text{Ecuación 1.2.}$$

$$DA(\%) = (A_{1655} / A_{3450}) \times 115 \quad \text{Ecuación 1.3.}$$

En la **Figura 1.12.** se pueden observar la bandas características del quitosano: grupo OH a 3450 cm^{-1} , grupo NH a 3282 cm^{-1} , grupo CH a 2862 cm^{-1} , amida I a 1655 cm^{-1} , CH_3 a 1417 cm^{-1} , amida III a 1313 cm^{-1} , tensión asimétrica del enlace C-O-C a 1154 cm^{-1} y tensión CH de los grupos anoméricos a 896 cm^{-1} .

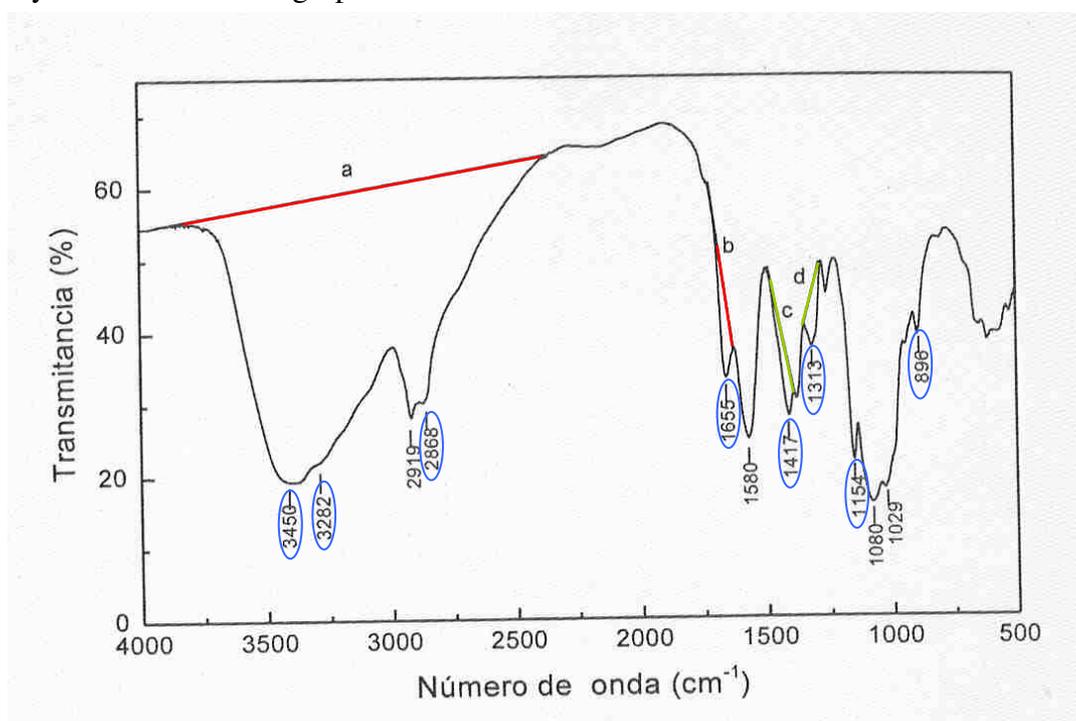


Figura 1.12. Espectro FTIR de una muestra de quitosano. Las líneas base **a** y **b** son las utilizadas por Baxter (Ecuación 1.3.) y las líneas base **c** y **d** son las utilizadas por Brugnerotto (Ecuación 1.2.).

Espectroscopia UV

La técnica de espectrofotometría de primera derivada en UV-visible se caracteriza por ser rápida, no destructiva y por proporcionar resultados precisos. Se basa en que los espectros de primera derivada de las soluciones de N-acetilglucosamina (GlcNAc), cuando se trabaja a diferentes concentraciones de ácido acético, presentan un punto isobéptico a la longitud de onda de 199 nm. En este punto la absorbancia depende linealmente de la concentración de GlcNAc y no está influenciada por la presencia de ácido acético. A partir de una recta de calibrado de GlcNAc se puede determinar el grado de desacetilación del quitosano (Muzzarelli y Rochetti, 1985).

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

Es un método simple y rápido. Se utiliza tanto la espectroscopia RMN de ^1H como la de ^{13}C . La espectroscopia de ^{13}C -RMN se puede utilizar para estimar el grado de N-acetilación de muestras de quitosano insolubles, es decir, aquellos que presentan un elevado grado de acetilación. Ambas técnicas nos dan información tanto del grado de acetilación como de la estructura del polímero (Inoue, 1997).

Valoración potenciométrica

Consiste en disolver quitosano en un exceso conocido de HCl y se valora con NaOH. Se obtiene, así, una curva de pH frente a volumen de NaOH añadido que presenta dos puntos de inflexión. La diferencia de volumen entre estos dos puntos se corresponde con el ácido consumido para la protonación de los grupos amino y permite determinar el grado de acetilación. La valoración se realiza utilizando un pH-metro (Muzzarelli, 1977).

Valoración conductimétrica

Este método fue descrito por Raymond y colaboradores (Raymond y col., 1993) y se basa en valorar una solución de quitosano en exceso de HCl con una solución de NaOH utilizando, en este caso, un conductímetro.

De todos estos métodos la espectroscopia infrarroja es el más utilizado debido a su simplicidad.

1.2.2.2. Determinación del peso molecular

El peso molecular del quitosano representa una media de los pesos de las moléculas presentes en la muestra. El peso molecular se suele expresar normalmente como número molecular promedio \overline{M}_n o como peso molecular promedio.

Algunos de los métodos utilizados para determinar el peso molecular son: la viscosimetría, la dispersión de luz y la cromatografía de permeación de gel.

Viscosimetría

Es el método más utilizado. Se basa en la obtención de la viscosidad intrínseca $[\eta]$, que está relacionada con el peso molecular según la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada.

$$([\eta]) = KM_v^a \quad \text{Ecuación 1.4.}$$

siendo,

M_v el peso molecular promedio viscosimétrico

K y a dos constantes que dependen de la naturaleza del polímero, del solvente utilizado y de la temperatura.

Dispersión de luz

Esta técnica permite determinar de forma directa el peso molecular promedio en peso, M_w , del polímero. Es una técnica rápida y no destructiva que nos proporciona medidas absolutas sin la necesidad de utilizar ningún material de referencia (Muzzarelli, 1987). A pesar de que la dispersión de luz ofrece información importante sobre el polímero y su interacción con el medio, ha sido poco utilizada con el quitosano ya que en ocasiones los resultados son de difícil interpretación, especialmente cuando existe agregación o asociación.

Cromatografía de permeación en gel

La cromatografía de permeación en gel (GPC) permite determinar el peso molecular además de la distribución de pesos moleculares del polímero (Lorenzo, 1994). Consiste en hacer pasar una disolución diluida del polímero a través de una columna rellena de un gel líquido poroso. Las moléculas del polímero difunden a través de la columna en función de su tamaño. Las moléculas más grandes penetran poco o ni siquiera penetran

en los poros del gel y fluyen más rápido, mientras que las pequeñas realizan un recorrido mayor penetrando por los poros. Así, tiene lugar una separación en función de sus tamaños moleculares. Se puede registrar la cantidad de polímero eluido para cada tiempo de retención (t_r) o volumen de retención (V_r) utilizando un detector de índice de refracción. El peso molecular deberá ser determinado tras una calibración que normalmente se realiza con patrones comerciales del exopolisacárido pululano.

1.2.2.3. Solubilidad

La presencia de grupos amino a lo largo de la cadena de quitosano permite la disolución de esta macromolécula en disoluciones de ácidos diluidos, por medio de la protonación de esos grupos. En medios ácidos diluidos tiene lugar el siguiente equilibrio:



Al adquirir carga positiva la amina, el quitosano aumenta su capacidad hidrofílica y pasa a ser soluble en soluciones ácidas diluidas formando sales ya que el pK_a del grupo amino en el quitosano es 6,5 (Tommeraas y col, 2001).

En ácidos inorgánicos se puede solubilizar en clorhídrico, bromhídrico, iodhídrico, nítrico y perclórico diluidos. En cambio es insoluble en ácido sulfúrico diluido. También es insoluble en la gran mayoría disolventes orgánicos. El quitosano, al igual que la quitina, es insoluble en agua.

1.2.3. Propiedades funcionales

El quitosano posee las siguientes propiedades funcionales: formación de películas, capacidad de gelificación, adsorción de metales, adsorción de células y proteínas, y puede reaccionar con péptidos o proteínas. En relación con la presente Tesis, la formación de películas, adsorción de agua y la reacción con péptidos y proteínas son las más interesantes.

Formación de películas de quitosano

El quitosano tiene la capacidad de formar películas con buenas propiedades mecánicas y de permeabilidad (Muzzarelli, 1977).

Las propiedades mecánicas de las películas de quitosano dependen del peso molecular de la muestra, de su grado de cristalinidad y del contenido de humedad de las mismas (Samuels, 1981). Además, presentan una excelente adhesión a diferentes tipos de superficies y una buena elasticidad.

Adsorción de agua

Las películas de quitosano se hinchan en contacto con el agua debido a la presencia de grupos hidroxilo y amino en su estructura. El índice de hinchamiento depende del peso molecular y grado de desacetilación del polímero. Según Wan y colaboradores (Wan y col., 2003) el índice de hinchamiento es mayor cuanto mayor es el peso molecular, no obstante con el grado de desacetilación se observa la tendencia contraria, disminuye al aumentar el grado de desacetilación. Cabría esperar un aumento en el índice de hinchamiento al aumentar el grado de desacetilación ya que el contenido del grupo amino sería mayor. Este comportamiento podría ser debido a que los puentes de hidrógeno intramoleculares que se establecen entre los grupos hidroxilo y los grupos amino son mucho más fuertes que los que se establecen entre estos grupos polares y el agua.

Interacción con péptidos o proteínas

El conocimiento sobre el papel de las interacciones proteína-polisacárido es aún limitado. La distinción más importante que puede hacerse es entre interacciones covalentes y no covalentes.

Conjugados covalentes de proteína hidrofoba-polisacárido hidrófilo

La unión covalente entre estos dos biopolímeros tiene como propósito la formación de un conjugado estable que combina las propiedades de superficie del componente hidrofóbico proteico con las propiedades estabilizadoras del polisacárido hidrofílico.

Para la unión de quitosano con proteínas, se ha descrito el calentamiento controlado de las proteínas y los quitosanos en condiciones de baja actividad de agua, lo que da lugar a la reacción de Maillard (Kato, 2002).

Interacciones proteínas-polisacáridos no covalentes

Estas interacciones pueden ser iónicas, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno o hidrofóbicas (Dickinson, 1998). El resultado puede ser una unión débil (reversible) o fuerte (poco reversible), ello depende de las condiciones del medio acuoso. Las condiciones para la formación de complejos son el pH, la relación de polímero, la concentración de polímero, la temperatura, el tiempo de reacción y la fuerza iónica.

1.2.4. Propiedades biológicas

El quitosano es un polímero natural, no tóxico y biodegradable. Además puede actuar como agente reductor del colesterol y como estimulante del sistema inmunológico (Muzzarelli, 1977).

Propiedades antimicrobianas

La actividad antimicrobiana del quitosano dependerá de factores como el tipo de quitosano (grado de desacetilación, peso molecular), del pH del medio, de la temperatura, etc.

Existen varias hipótesis sobre el mecanismo de la actividad antimicrobiana del quitosano. La más plausible es un cambio en la permeabilidad de la célula debido a las interacciones entre el quitosano que es policatiónico y las cargas electronegativas de la superficie de la célula (Devlieghere, 2004).

El quitosano es capaz de inhibir algunas bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio spp.* y *Salmonella typhimurium*. Debido a que es una macromolécula no puede atravesar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, ya que esta membrana actúa como una barrera contra las macromoléculas (Nikaido, 1996).

1.2.5. Hidrólisis enzimática del quitosano

El quitosano es hidrolizado principalmente por las quitinasas y las quitosanasas, aunque también puede ser hidrolizado por enzimas comerciales como glucanasas, pectinasas, lipasas y algunas proteasas.

Las quitinasas son endo- β -1,4-N-acetilglucosaminidasas que hidrolizan los enlaces β -1,4-glicosídicos de quitinas, quitodextrinas y quitosanos parcialmente acetilados de forma aleatoria (Ohtakara, 1988). Están presentes en hongos, insectos, algunas bacterias y en plantas superiores. Las bacterias producen quitinasas para digerir la quitina y utilizarla como fuente de carbono y energía mientras que en las plantas las quitinasas están involucradas en mecanismos de defensa frente a patógenos que contienen quitina.

Las quitosanasas catalizan la degradación del quitosano parcialmente acetilado de forma endo-hidrolítica. La capacidad para hidrolizar quitosanos con diferente grado de desacetilación depende del microorganismo que produce la quitosanasa. En función de la especificidad del sustrato las quitosanasas microbianas se pueden dividir en dos grupos I y II. Las que pertenecen al grupo I sólo pueden hidrolizar quitosano, mientras que las que pertenecen al grupo II pueden hidrolizar quitosano y carboximetilcelulosa (Chiang y col., 2003).

Las quitinasas y quitosanasas no están disponibles para aplicarlas a escala industrial, además su coste es muy elevado. La despolimerización del quitosano se puede realizar con enzimas inespecíficos (Terbojevich y col., 1996; Muzzarelli y col. 1994; Muzzarelli y col. 1997). Se han utilizado celulasas, pectinasas, lipasas y proteasas para despolimerizar el quitosano. Entre las proteasas podemos destacar a la papaína, una proteasa particularmente atractiva debido a su origen vegetal. Otra proteasa que despolimeriza de forma eficiente el quitosano es la pronasa, una serin proteasa obtenida a partir de *Streptomyces griseus*, obteniéndose quitosano de bajo peso molecular, oligómeros y monómeros. La máxima despolimerización con pronasa tiene lugar a pH 3,5 y 37°C (Kumar, 2004).

1.2.6. Aplicaciones

El quitosano debido a sus propiedades, físico-químicas, funcionales y biológicas tiene una gran variedad de aplicaciones que abarcan campos tan diferentes como la medicina, la farmacia, la agricultura, la alimentación y el sector textil entre otros.

Aplicaciones biomédicas

El quitosano al ser un polielectrolito lineal con alta densidad de carga positiva tiene capacidad para adherirse a materiales cargados negativamente. Por lo tanto, puede enlazarse con superficies celulares, formar geles con polianiones y además tiene la capacidad de formar membranas. Debido a su biocompatibilidad ha sido utilizado en ingeniería de tejidos ya que las células se adhieren fuertemente a él y, en general, proliferan adecuadamente. También ha sido utilizado para el tratamiento de heridas y quemaduras debido a su capacidad hemostática y al efecto de aceleración en la curación de heridas.

Aplicaciones farmacéuticas

En la industria farmacéutica se ha estudiado el uso del quitosano como agente para la liberación controlada de fármacos, como agente reductor del colesterol, y como estimulante del sistema inmunológico.

Aplicaciones en agricultura

En agricultura el quitosano se emplea principalmente: a) para recubrir frutos y protegerlos frente a microorganismos gracias a sus propiedades antimicrobianas (Galed y col., 2001; Galed, 2004) y b) como matriz para la liberación de agroquímicos para combatir las plagas o para suministrar nutrientes de forma controlada.

Aplicaciones en alimentación

El quitosano es usado en la industria alimentaria, particularmente en Japón, formulado en galletas, productos avinagrados y fideos debido a su acción hipocolesterolemica. También se emplea como conservante de los zumos de frutas, como película con propiedades antimicrobianas para cubrir frutas (El-Ghaouth y col., 1991; Jiang y Li, 2001), clarificación de zumos de frutas (Soto-Peralta y col., 1989).

Aplicaciones en la industria textil

La utilización del quitosano está cada vez más presente en el sector textil. Existen tres formas de aplicación: a) producción de fibras, b) auxiliar textil, y c) aplicado en procesos de acabado lo que mejora propiedades de fibras naturales como lana y algodón

(Hudson y Cuculo, 1980). En el año 1926 se fabricaron las primeras fibras de quitosano, las cuales se utilizaron básicamente para la producción de suturas.

El tratamiento con quitosano, actualmente se considera un método práctico para modificar la topografía de la superficie de las fibras.

Más recientemente se ha realizado una amplia investigación sobre la capacidad del quitosano para formar fibras (Rathke y Hudson, 1994). Uno de los métodos consiste en disolver el polímero en un solvente y coagular la solución en un baño (5% NaOH).

El quitosano debido a su estructura molecular interacciona con la mayoría de colorantes excepto con los básicos cuya afinidad es baja. Así por ejemplo se utiliza para disminuir la carga de colorantes de los efluentes ya que el quitosano posee la capacidad de fijar cantidades apreciables de colorante por adsorción en disolución acuosa (Smith, 1993). El pH del agua residual es un factor importante en la adsorción de ciertos colorantes sobre el quitosano ya que a bajo pH los grupos amino libres del quitosano se encuentran protonados y pueden atraer a los colorantes aniónicos.

También se utilizó un gel de quitosano para inmovilizar celulasas. Estas enzimas eliminan pequeñas partículas de la superficie de las fibras de celulosa que se forman por el uso. Inmovilizando estas enzimas fue posible fabricar un producto que se podía añadir durante los lavados domésticos. Estas enzimas, además, podían actuar como agentes suavizantes.

El quitosano también se utiliza en los procesos de acabado de los tejidos. La mayoría de estos procesos están destinados a aumentar el peso del tejido, suavizar su superficie, repeler el agua, aceite y microorganismos. La presencia de quitosano sobre la lana aumenta la adsorción del colorante (Davidson y Xue, 1994; Filipowska y col., 2002; Jovic y col., 1997; Vélchez y col., 2001; Jovic y col., 2005) y contribuye a la reducción del encogimiento (Masri y col., 1978; Julià y col., 1997). También se ha mostrado que el quitosano durante la tintura aumenta el agotamiento de los colorantes directos (Canal y col., 1997), mejora la cobertura con colorante de las fibras de algodón inmaduras (Bahmani y col., 2000). También puede ser utilizado como espesante y en la estampación del algodón (Mehta y Combs, 1997).

1.3. ENZIMAS

El nombre enzima fue propuesto por el fisiólogo alemán Fredrich Wilhem Kühne en 1878 y deriva de la frase griega *en zyme* que significa “en levadura”. Los enzimas son la clase más extensa y especializada de proteínas. Su función es la de catalizar reacciones químicas específicas en los seres vivos, permitiendo que reacciones que tienen lugar a velocidades muy bajas se realicen a mayor velocidad. Los enzimas son proteínas globulares, solubles en agua.

1.3.1. Factores que afectan a la actividad enzimática

Debido a la naturaleza proteica los enzimas se ven afectados en su actividad y estructura por los mismos factores que afectan a las demás proteínas, entre los que cabe destacar: el pH y la temperatura.

Efecto del pH

Tanto en la transformación del sustrato en producto (proceso catalítico), como en la fijación del sustrato al sitio activo del enzima, intervienen grupos con carácter ácido-base, por este motivo el pH del medio afecta a la actividad de la gran mayoría de los enzimas. De hecho la mayoría de enzimas sólo son activos en un estrecho intervalo de pH. Por arriba o por debajo de este intervalo de pH, la actividad disminuye.

La desnaturalización del enzima es otro factor que influye en la pérdida de actividad a pH extremos, puesto que la estabilidad del enzima se debe, en gran medida, a la presencia de puentes de hidrógeno entre los diferentes grupos de la proteína. El aumento o disminución del pH afecta al estado de protonación, y por tanto a su capacidad para formar puentes de hidrógeno.

Efecto de la temperatura

En general cuando se estudia la velocidad de una reacción química en función de la temperatura y en ausencia de un enzima, se observa un incremento de la velocidad conforme se aumenta la temperatura. En cambio, cuando la reacción está catalizada por un enzima, se observa una fase ascendente en la actividad, seguida de un máximo y de una última fase en la que la actividad se pierde. Conforme la temperatura va aumentando, la energía térmica de la cadena polipeptídica se incrementa y comienza a

predominar sobre las fuerzas que mantienen la estructura nativa del enzima. En estas condiciones la proteína se desnaturaliza y la actividad se pierde.

1.3.2. Unión del enzima al sustrato y acción enzimática

La catálisis enzimática comienza con la combinación de un enzima (E) con una molécula de sustrato (S) para formar un complejo ES ($E+S \rightarrow ES$). La molécula sustrato se une en una región específica del enzima, denominada sitio activo que es una hendidura en la estructura tridimensional del enzima donde se lleva a cabo el proceso catalítico.

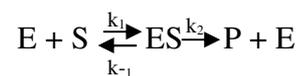
El sitio activo tiene algunas características particulares que son comunes para la mayoría de los enzimas:

- Exhibe especificidad, es decir, puede discriminar entre diversas moléculas de posibles sustratos. El sitio activo tiene una forma que se asemeja bastante a la del sustrato. El sustrato correcto se ajusta perfectamente en el sitio activo.
- El sitio activo es una región tridimensional relativamente pequeña del enzima. El sustrato unido, interactúa directamente quizá con no más de tres a cinco residuos de aminoácidos cuando está completamente encajado en el sitio activo.
- Los sustratos son retenidos inicialmente en el sitio activo por fuerzas intermoleculares de carácter débil, interacciones de Van der Waals, electrostáticas, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno que posibilitan que esa unión se pueda romper con facilidad tras la acción enzimática.

Existen dos modelos sobre la forma en la que el sustrato se une al centro activo del enzima, el modelo llave-cerradura y el del ajuste inducido. El primero fue propuesto por Emil Fisher en 1890 y consiste en que el sitio activo del enzima (la cerradura) sólo acepta un tipo específico de sustrato (la llave). Este modelo considera que el sitio activo es inflexible o muy rígido. En 1958 Daniel Koshland propuso el modelo del ajuste inducido en el que tenían lugar cambios conformacionales en la región del sitio activo cuando se unía a él el sustrato. Datos cristalográficos actuales de las moléculas de enzima libre y de los complejos enzima-sustrato demuestran que, en efecto, ocurren tales cambios conformacionales cuando se forma el complejo enzima-sustrato.

La actividad catalítica de algunos enzimas requiere la presencia de compuestos no proteicos llamados cofactores. Los cofactores pueden ser iones metálicos o moléculas orgánicas conocidas como coenzimas. Algunos cofactores, sólo se hallan asociados transitoriamente con el enzima, mientras que otros, conocidos como grupos prostéticos, se hallan asociados de forma permanente. El complejo enzima-cofactor activo catalíticamente se llama holoenzima. La proteína inactiva enzimáticamente que resulta de la separación del cofactor de un holoenzima se designa como apoenzima (Voet y Voet, 1990).

En cualquiera de las reacciones catalizadas, el enzima [E] y el sustrato [S] forman, en primer lugar, el complejo enzima-sustrato [ES] que, tras la acción enzimática da lugar al producto final [P] y al enzima [E].



Cuando se mantiene constante la concentración de un enzima se observa que el aumento en la velocidad de reacción es proporcional al incremento en la concentración del sustrato. Este proceso se mantiene hasta que en cierto momento los incrementos de concentración del sustrato no producen un aumento significativo de la velocidad de reacción. Decimos que se ha alcanzado la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) ya que en estas condiciones el enzima está saturado por el sustrato y no puede actuar con mayor rapidez. Este fenómeno llevó a Michaelis y Menten a formular una teoría general de la acción enzimática.

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Ecuación 1.5.}$$

dónde,

V es la velocidad de reacción

V_{max} la velocidad máxima de reacción

[S] la concentración de sustrato

K_M la constante de Michaelis-Menten, que representa la concentración de sustrato a la que un enzima alcanza la mitad de la V_{max} .

Esta expresión (Ecuación 1.5.) es la ecuación básica de la cinética enzimática y es válida para una concentración de sustrato no saturante.

La magnitud de K_M varía ampliamente con el enzima y con la naturaleza del sustrato. Es también función de la temperatura y del pH (Voet y Voet, 1990). Esta constante proporciona una idea de la afinidad del enzima por el sustrato, a menor K_M mayor afinidad.

1.3.3. Clasificación de los enzimas

Los enzimas se clasifican de acuerdo con la naturaleza de las reacciones químicas que catalizan. La “International Union of Pure and Applied Chemistry” (I.U.P.A.C.) y la “International Union of Biochemistry” (I.U.B.) establecieron seis clases principales de reacciones que catalizan los enzimas. A cada enzima se le asignan dos nombres y una clasificación de cuatro números.

Oxidorreductasas: Intervienen en reacciones de transferencia electrónica en las que un compuesto gana electrones a costa de otro compuesto que se oxida. Se pueden distinguir dos grupos:

Deshidrogenasas: son enzimas oxidantes que separan hidrógenos del sustrato.

Oxidadasas o reductasas: toman electrones del sustrato y lo ceden al oxígeno.

Transferasas: Catalizan la transferencia de un sustrato a otro, de grupos funcionales o radicales distintos del hidrógeno.

Hidrolasas: Catalizan reacciones de hidrólisis introduciendo grupos ^-OH y ^-H . Dependiendo del enlace hidrolizado tendremos:

Esterasas: enlaces tipo éster

Carbohidrasas: enlaces glicosídicos

Peptidasas: enlaces peptídicos

Amidasas: enlaces tipo amida

Anhidrasas: enlaces anhídrido de ácido

Liasas: Catalizan reacciones de rotura o soldadura de sustratos.

Isomerasas: Catalizan reacciones de isomerización.

Ligasas: Catalizan la formación de enlaces por hidrólisis del adenosín trifosfato (ATP).

1.3.4 Enzimas en la industria textil

La aplicación de los enzimas en la industria textil comenzó alrededor de 1857 cuando se utilizó el extracto de malta para eliminar el ensimaje de los tejidos antes de la estampación (McCarthy, 1999).

Los enzimas se han utilizado durante más de 50 años en la industria textil, así como también en la producción de detergentes, y en la industria alimentaria. En estas industrias los enzimas han reemplazado a los productos químicos y así se ha disminuido el consumo de agua, energía y materia cruda. De hecho, los tratamientos clásicos presentan algunos efectos negativos como el empleo de agentes agresivos y la elevada demanda de agua y energía, mientras que los enzimas son seguros y fáciles de controlar ya que:

- actúan solamente sobre sustratos específicos:
- trabajan bajo condiciones suaves de pH, temperatura y presión
- aceleran las reacciones: disminuyendo la energía de activación para que tenga lugar la reacción.
- pueden reemplazar a compuestos químicos
- son biodegradables

Sin embargo, los enzimas presentan algunas desventajas. La principal desventaja es su elevado coste (aunque el proceso textil pueda ser menos costoso). Son más caros que la mayoría de los productos químicos. Son sensibles a la temperatura, pH, humedad y a los contaminantes y su almacenamiento es más difícil porque tienen un tiempo de vida media inferior al de la mayoría de los productos químicos.

1.3.5. Proteasas

Las proteasas hidrolizan los enlaces peptídicos y constituyen el grupo EC 3.4.X.X. de las hidrolasas. Debido a que son fisiológicamente necesarias para la vida de los organismos se pueden encontrar en una amplia diversidad de fuentes como plantas, animales y microorganismos. La papaína, la bromelanina y las queratinasas son proteasas obtenidas de plantas. Las proteasas de origen animal más conocidas son las de origen pancreático como la tripsina, quimiotripsina, pepsina y renina. A pesar de que se pueden obtener proteasas de animales y plantas no se cubren las demandas que existen

actualmente, por este motivo los microorganismos representan una excelente fuente de enzimas debido a su amplia diversidad bioquímica y a que se pueden manipular genéticamente. La mayoría de proteasas comerciales, principalmente neutras o alcalinas pertenecen al género *Bacillus* (Rao y col., 1998).

Las proteasas se pueden dividir en dos grandes grupos, endopeptidasas y exopeptidasas dependiendo del sitio de acción. Las endopeptidasas rompen el enlace peptídico en el interior de la proteína mientras que las exopeptidasas actúan en una zona cercana a los extremos carboxi o amino terminal.

Las endopeptidasas se dividen en cuatro grupos dependiendo de su mecanismo catalítico: serinproteasas, metaloproteasas, cisteinproteasas y aspárticoproteasas (Rao y col., 1998). Las serinproteasas tienen en común la presencia en el centro activo de la tríada Ser-His-Asp. Este grupo de proteasas incluye dos familias, las serinproteasas de origen mamífero como la tripsina y quimiotripsina y las de origen bacteriano como la subtilisina. En este trabajo una de las preparaciones enzimáticas que se han utilizado ha sido Esperase 8.0L que contiene subtilisina.

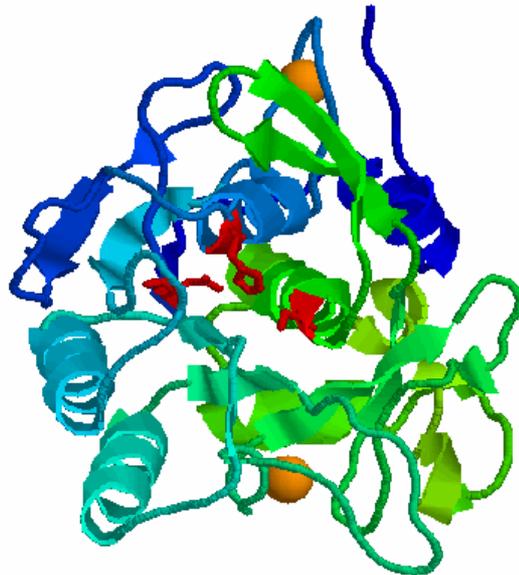


Figura 1.13. Estructura tridimensional de la subtilisina (University of Maine, 2003).

En las serinproteasas, el proceso catalítico se inicia con el ataque nucleofílico de la Ser activa sobre el átomo de carbono carbonílico del péptido a romper, formando el estado de transición que es un intermedio tetraédrico. El intermedio tetraédrico, que es estabilizado por su fijación preferencial al sitio activo del enzima, se descompone a continuación dando el intermedio acil-enzima, gracias al impulso recibido por la

donación de un protón desde la His 57, que está polarizada por el Asp 102. Después de reemplazar el grupo saliente por agua del disolvente, se invierte el proceso catalítico, rindiendo el segundo producto y regenerando el enzima (Voet y Voet, 1990).

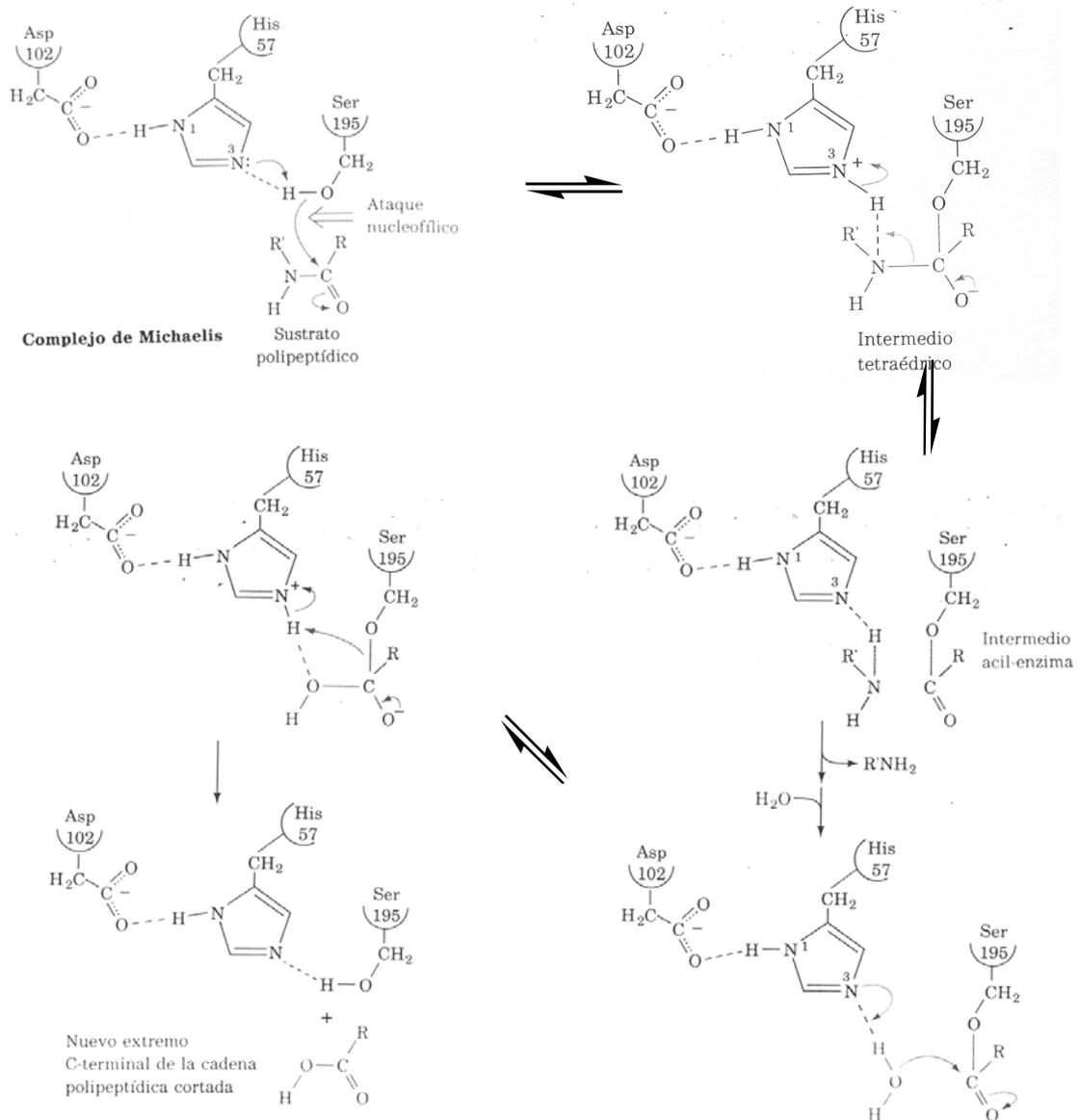


Figura 1.14. Mecanismo catalítico de las serinproteasas (Voet y Voet, 1990).

Se ha descrito que la aplicación de proteasas en fibras de la lana imparte un tacto suave al tejido modificando la estructura de la fibra de lana. La acción fundamental es suavizar el perfil de las escamas de las fibras minimizando el efecto de fricción direccional entre fibras. También reduce el pildeo y confiere a los tejidos de lana una cierta resistencia al encogimiento.

1.4 PLASMA

1.4.1. Definición

Se conoce como plasma un gas parcialmente ionizado que contiene iones, electrones, radicales y partículas neutras. Este estado del gas se puede producir por la acción de temperaturas elevadas, por la aplicación de un fuerte campo electromagnético a baja presión o por cualquier fuente de energía capaz de proporcionar el trabajo necesario de ionización y excitación de una especie molecular neutra.

En un plasma existe el mismo número de cargas negativas (electrones), que de cargas positivas (iones). La presencia de estas cargas da lugar a que el plasma sea un buen conductor. Además de estas partículas cargadas, el plasma contiene partículas sin carga como radicales libres (R^{\cdot}), moléculas y átomos excitados de elevada reactividad (Erra y col., 1999a). Los radicales libres no están cargados eléctricamente pero transportan una gran cantidad de energía capaz de atacar enlaces químicos presentes en las superficies de materiales orgánicos. Asimismo, los radicales libres son responsables de una gran variedad de reacciones diferentes y de la generación de luz ultravioleta en el reactor de plasma. Como el plasma es altamente reactivo, las reacciones que se producen tienen lugar a tiempos cortos y se limitan solamente a la superficie.

1.4.2. Tipos de plasmas

Los plasmas se pueden dividir en dos categorías, plasmas de alta presión o de equilibrio termodinámico (arcos y antorchas) y plasmas de baja presión o de no equilibrio (descargas luminiscentes).

Plasmas de equilibrio termodinámico: se encuentran cerca del equilibrio termodinámico, es decir, la temperatura electrónica (T_e), la iónica (T_i) y la del gas (T_g) son iguales ($T_e=T_i=T_g$). Estos plasmas tienen una densidad electrónica del orden de 10^{20} - 10^{25} m^{-3} , temperatura electrónica entre 0,1 y 2 eV (1eV=11600 K) y suelen ser fuentes de calor (en estos plasmas la energía eléctrica se transforma en energía térmica).

Plasmas de no equilibrio: son descargas de baja densidad ($n_e=10^{15}$ - 10^{18} m^{-3}), baja presión (0,1-1000 Pa) y grado de ionización (n_e/N) muy bajo (10^{-3} - 10^{-5}) y no se encuentran en equilibrio térmico ($T_e= 1$ - 10 eV $\gg T_i=T_g$). También se denominan plasmas fríos o de baja temperatura, ya que la temperatura del gas y de los iones puede

ser próxima a la temperatura ambiente y se distinguen, principalmente, por la luz que emiten, que proviene de la relajación de los átomos excitados. Por este motivo también se conocen como descargas luminiscentes.

1.4.3. Componentes de un equipo de plasma

Los componentes de un equipo de generación de plasma son los siguientes:

1. Suministrador de potencia: se utiliza la energía eléctrica. La potencia requerida oscila desde los 10 hasta los 5000 vatios dependiendo del tamaño del reactor y del tratamiento que se desee.
2. Cámara de reacción: lugar donde se coloca el material a tratar. La cámara puede ser de cuarzo o de metal. Las de cuarzo se utilizan cuando se necesita trabajar en condiciones extremas de limpieza. Las de metal suelen ser de aluminio ya que su conductividad eléctrica y térmica es excelente y no es atacado por ningún tipo de plasma excepto los que se obtienen a partir de cloro, bromo y yodo.
3. Sistema de generación de vacío: es necesario para mantener el régimen de presión/flujo de gas deseado.
4. Adaptador de impedancias: se encarga de acoplar la impedancia de entrada de la cámara de reacción con la impedancia de salida del suministrador de potencia.
5. Sistema de control: su misión es controlar todas las variables del proceso como el tipo de gas, presión, velocidad de flujo, potencia y tiempo de procesado.

1.4.4. Ventajas del plasma

El tratamiento con plasma presenta una serie de ventajas:

- Proceso limpio y seco
- Proceso seguro para los operarios: no se utilizan ni disolventes ni ácidos que puedan ocasionar accidentes graves.

- Se mantiene la integridad del material a tratar: solamente quedan afectadas las capas moleculares más externas de la superficie del material, de 2 a 20 nm de grosor. Consecuentemente, sólo se modifican las propiedades superficiales del material mientras que permanecen las propiedades físicas, químicas y mecánicas del interior del material.
- Fácil de manejar: no se requieren conocimientos específicos.
- Económico: respecto a los procesos convencionales es un proceso en el que se ahorra agua y energía
- No genera problemas ambientales: es un proceso respetuoso con el medio ambiente ya que no contamina los efluentes ni produce polución.

1.4.5. Modificaciones inducidas en la lana tratada con plasma

1. Las especies activas del plasma únicamente producen modificaciones en la superficie de la fibra sin alterar el interior de la misma (Rakowski, 1997).

2. Cuando se utiliza oxígeno, aire u óxido de nitrógeno como gas de plasma se produce una oxidación de la superficie. Los análisis de espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS) de superficies de fibras de lana tratadas revelan una reducción del carbono alifático y la presencia de óxidos de azufre y de grupos carboxi (Bradley y col., 1992; Molina y col., 2000). Como consecuencia de ello se incrementa la hidrofilia, la resistencia al encogimiento, la capacidad de adhesión y de reacción y la afinidad hacia los colorantes (Erra y col., 1999a).

3. Cuando se utilizan gases nobles como helio y argón se produce una erosión o micrograbado de la superficie que da lugar a un incremento del área de la superficie de las fibras (Erra y col., 1999a)

4. El contenido de materia lipídica se reduce a un tercio y el de agua en un 3% (Rakowski, 1997).

5. Las propiedades tintóreas mejoran ya que se produce un aumento del agotamiento del colorante. Wakida lo atribuye a la relajación del complejo membranosos celular (CMC) que facilita la difusión del colorante hacia el interior de la fibra (Wakida y col., 1996)

Dependiendo del tipo de gas utilizado se puede producir la formación de microcráteres en la superficie de las fibras de lana tal como puede observarse en la **Figura 1.15.** al utilizar un plasma de oxígeno en un reactor de microondas (Erra y col., 1999b).

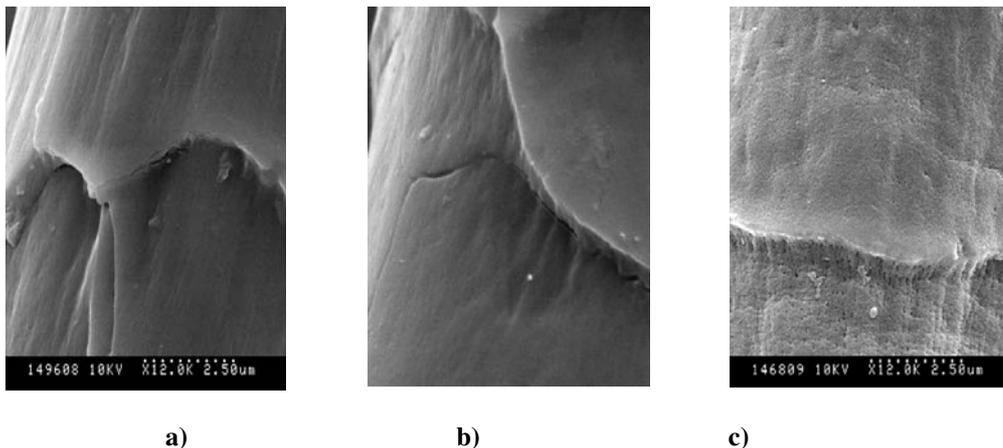


Figura 1.15. Micrografías de SEM de lana tratada con plasma (1 mbar, 200 W, 5 minutos) en un reactor de microondas, a) no tratada, b) plasma de aire, c) plasma de oxígeno.

1.5. DISEÑO DE EXPERIMENTOS

El diseño de experimentos es una metodología basada en herramientas matemáticas y estadísticas cuyo objetivo es ayudar al experimentador a:

1. Seleccionar la estrategia experimental óptima que permita obtener la información buscada con el mínimo coste.
2. Evaluar los resultados experimentales obtenidos, garantizando la máxima fiabilidad en las conclusiones que se obtengan (Ferré y Rius, 2003).

El diseño estadístico de experimentos se refiere al proceso para planear el experimento de tal forma que se recaben datos adecuados que puedan analizarse con métodos estadísticos que llevarán a conclusiones válidas y objetivas (Montgomery, 2002). Además, permite diseñar, ejecutar y analizar cualquier serie de datos con el fin de obtener la máxima información con el mínimo número de experiencias (Box y col., 1999). El enfoque estadístico del diseño experimental es necesario si se quieren sacar conclusiones significativas de los datos. Cualquier problema experimental incluye dos aspectos: el diseño del experimento y el análisis estadístico de los datos.

Es importante planificar la experimentación ya que está limitada por el coste en tiempo y en recursos. Por lo tanto una experimentación óptima tendrá que contemplar el menor número de experiencias que permitan obtener la información buscada.

El análisis de los resultados experimentales permitirá obtener conclusiones sobre el sistema en estudio y decidir actuaciones futuras. Esta planificación y análisis es el principal objetivo del diseño estadístico de experimentos.

Los métodos estadísticos pueden incrementar en gran medida la eficiencia de los experimentos y con frecuencia pueden fortalecer las conclusiones así obtenidas. El uso correcto de las técnicas estadísticas implica los siguientes puntos:

1. Uso de conocimientos no estadísticos del problema: es necesario tener conocimientos del campo en el que se va a aplicar con el fin de poder determinar los factores, sus niveles, interpretar los resultados del análisis, etc.
2. Mantener el diseño y el análisis tan simple como sea posible
3. Tener presente la diferencia entre significación práctica y significación estadística: aunque dos condiciones experimentales produzcan respuestas medias que son estadísticamente diferentes puede que esta diferencia no sea de la magnitud suficiente como para tener un valor práctico (Montgomery, 2002).

1.5.1. Método tradicional de experimentación

El método tradicional de experimentación consiste en cambiar un factor cada vez. A partir de unas condiciones iniciales, se realizan experimentos en los que todos los factores se mantienen constantes excepto el que se está estudiando. De esta manera la variación de la respuesta se puede atribuir a la variación de un factor, y por tanto, revela el efecto de aquel factor. El razonamiento que apoya esta forma de actuar es que si se variasen dos o más factores entre dos experimentos consecutivos no sería posible conocer si el cambio en la respuesta ha sido debido al cambio de un factor o del otro o al de los dos a la vez.

Este método tradicional presenta inconvenientes cuando existe interacción entre factores ya que:

- No informa sobre cómo interactúa un factor con los otros factores o cómo estas interacciones afectan a la respuesta.
- No proporciona la posición del óptimo.

El experimentador percibe que se ha llegado al óptimo porque cambiando un factor cada vez la respuesta no mejora, sin embargo se puede encontrar lejos del óptimo real. Aunque se puede iniciar la experimentación partiendo del óptimo que se ha encontrado, esta solución es ineficiente cuando se tienen que estudiar muchos factores a muchos valores diferentes, ya que este método tradicional requeriría demasiado tiempo y experimentos.

1.5.2. Diseño estadístico de experimentos

El diseño estadístico de experimentos proporciona el marco matemático para cambiar todos los factores simultáneamente y obtener la información buscada con un número reducido de experimentos, es decir, con la máxima eficiencia.

La aplicación del diseño de experimentos requiere considerar las siguientes etapas:

1. Comprender el problema y definir claramente el objetivo.
2. Identificar los factores que potencialmente podrían influir en la función objetivo y los valores que éstos pueden tomar. Entre estos valores se buscará la información necesaria.
3. Establecer una estrategia experimental que recibe el nombre de plan de experimentación.
4. Efectuar los experimentos con los valores de los factores decididos en el punto 3 para obtener los valores de las respuestas estudiadas.
5. Responder a las preguntas planteadas.

Comprender el problema y definir claramente el objetivo.

El diseño estadístico de experimentos es una herramienta para encontrar respuestas a problemas perfectamente identificados y especificados. El objeto de aplicar estos métodos es hacer el proceso lo más eficaz posible.

Seleccionar los factores

Es muy importante identificar todos los factores que se cree que pueden influir en el proceso y en la respuesta. Los factores son las distintas condiciones experimentales que pueden ser modificadas. Para cada factor hay que definir el intervalo de valores que puede tomar (dominio experimental). Hay que tener en cuenta que la elección de los factores no es fácil. Es el experimentador quien decide dónde es interesante estudiar

estos factores. Esta decisión requiere un conocimiento previo del sistema, obtenido a partir de referencias bibliográficas, experiencia previa en el laboratorio, etc.

Planificar la experimentación. Elección del diseño experimental

Es frecuente realizar la experimentación en diversas etapas secuencialmente. En cada etapa, las series de experimentos se agrupan en diseños denominados matrices de experimentos. La selección de una matriz determinada depende del objetivo de cada etapa.

Criba: se deben elegir los factores en función de su influencia en la respuesta.

Estudio de los factores: cuando se han identificado los factores más importantes se debe estudiar su efecto en la respuesta y las interacciones.

Optimización: se trata de conocer cuáles son los valores de los factores que proporcionan respuestas con la calidad deseada. Éstos se pueden conocer calculando un modelo matemático llamado superficie de respuesta que relaciona los factores más relevantes con las respuestas.

Realización de la experimentación

El diseño experimental elegido está descrito utilizando variables codificadas. La ejecución de la experimentación debe realizarse en orden aleatorio para asegurar que los factores no contemplados introduzcan confusión en los resultados.

Interpretación de los resultados

Cuando se dispone de los resultados experimentales se pueden calcular los efectos de los factores, así como sus interacciones. Los tests estadísticos permiten comprobar si los efectos calculados son significativos comparándolos con el error experimental. Se puede construir un modelo de superficie de respuesta y utilizarlo para encontrar la zona óptima matemáticamente. La realización de estas etapas es cíclica. La información obtenida al realizar una serie de experimentos se debe de integrar para planificar la experimentación posterior. Puede que así se comprenda mejor el problema y se puedan volver a redefinir o concretar más los objetivos, se pueden descartar factores que se ha visto que no eran importantes o modificar su dominio experimental. De esta manera se plantea una nueva experimentación y así sucesivamente.