

CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO POR VISCOSIMETRÍA CAPILAR Y VALORACIÓN POTENCIOMÉTRICA

Luis G. Parada^{1*}, G. D. Crespín¹, R. Miranda² e Issa Katime³

¹⁾ Escuela de Química. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Universidad de El Salvador. Final 25 Avenida Norte, San Salvador, El Salvador. **Correo electrónico: luisquim@yahoo.com**

²⁾ Departamento de Ciencias Químicas. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli. México.

³⁾ Grupo de Nuevos Materiales y Espectroscopia Supramolecular. Departamento de Química Física. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco. Apartado 644. Bilbao. España. **Correo electrónico: qfpkaami@lg.ehu.es**

RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados de la caracterización del quitosano obtenido a partir de la modificación química de la quitina. Se ha aplicado el método de viscosimetría capilar para determinar el peso molecular promedio viscoso, a partir de la ecuación de Mark-Houwink; la técnica de análisis fue validada estadísticamente conforme a los criterios de linealidad y repetibilidad. Además, se realizaron valoraciones potenciométricas con el fin de conocer el grado de desacetilación del producto, el cual define las propiedades fisicoquímicas que diferencian la quitina del quitosano, como por ejemplo su solubilidad. Tanto la viscosimetría capilar como la titulación potenciométrica son métodos simples y muy útiles porque requieren de equipo de bajo costo y proporcionan información acerca de la calidad del polímero.

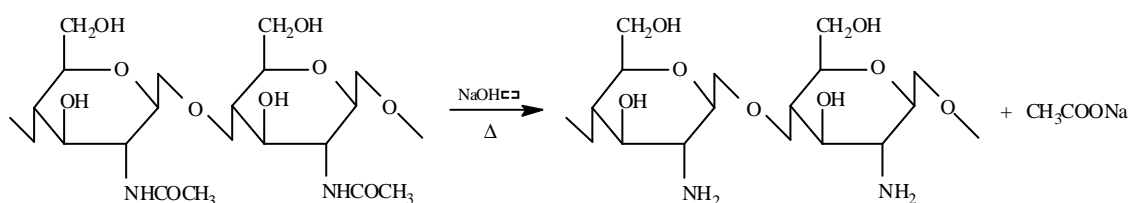
INTRODUCCIÓN

La quitina es un biopolímero tipo polisacárido, considerado a menudo como un derivado de la celulosa, la diferencia se encuentra en el grupo hidroxilo del carbono 2, el cual en la quitina ha sido sustituido por el grupo acetamida y cuyo monómero es: 2-

acetamido-2-deoxi-β-D-glucosa; la quitina es blanca, dura, inelástica y la mayor fuente de contaminación superficial de las áreas costeras [1,2]. El quitosano es el derivado N-desacetilado de la quitina, por lo tanto el quitosano es una amina primaria, y su monómero es 2-amino-2-deoxi-β-D-glucosa. La quitina y el quitosano son comercialmente importantes debido a su alto contenido de nitrógeno (6,89%). Además son recomendados como probables sustituyentes de los polímeros sintéticos debido a que estos tienen excelentes propiedades tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad, toxicidad nula, etc. [3].

La quitina (β-(1,4)-2-acetamido-2-deoxi-D-glucosa) es obtenida generalmente por un tratamiento químico de exoesqueletos de crustáceos entre ellos el camarón (también se encuentra en insectos, moluscos y hongos). El quitosano (β-(1,4)-2-amino-2-deoxi-D-glucosa) se obtiene por modificación química de la quitina, la cual es tratada con una solución alcalina concentrada y caliente, el polímero que se obtiene posee un comportamiento marcadamente básico debido al grupo amino libre en su estructura, lo cual además le proporciona ciertas características quimicofísicas de gran interés industrial.

La quitina es fácil de obtener del exoesqueleto de camarones o cangrejos, para ello se requiere un tratamiento químico con el fin de remover los pigmentos, las sales tales como el carbonato de calcio y las proteínas que se encuentran asociadas con ella. La obtención de quitosano se realiza por medio de un tratamiento con álcali concentrado y caliente, con el fin de retirar la mayor cantidad de unidades acetilo de la estructura del polímero; la ecuación química correspondiente al proceso es la siguiente:



La producción industrial de quitina y quitosano se realiza por lo general a partir de exoesqueletos de cangrejo y camarón, desechados de las industrias pesqueras y alimentaria. Para producir 1 kg de quitosano con grado de desacetilación del 70% se requiere de 6,3 kg

de HCl y de 1,8 kg de NaOH, 0,5 Tón de agua de proceso y 0,9 Ton de agua para enfriamiento. La quitina y el quitosano son producidos comercialmente en India, Japón, Polonia, Noruega y Australia. El precio del quitosano en pequeñas cantidades es de 7,5 USD por 10 g [3].

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos al caracterizar el quitosano obtenido por modificación de la quitina extraída de exoesqueletos de camarón. Los métodos utilizados para la caracterización de dicho material fueron la viscosimetría capilar y la titulación potenciométrica. Los resultados obtenidos indican que el quitosano producido cumple con los estándares de peso molecular promedio viscoso y grado de desacetilación aceptados para la aplicabilidad industrial de dicho material.

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención de la quitina. Los exoesqueletos de camarón, molidos y tamizados, se someten a un proceso de despigmentación química [4] con la mezcla de solventes: éter de petróleo, agua y acetona en la proporción 15/10/75 [5]. Para ello se coloca la harina en un matraz provisto de agitación magnética, por dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente se procede a filtrar el producto en un embudo Buchner y finalmente se seca en una estufa eléctrica a 50°C durante 6 horas. El producto obtenido en la fase anterior se somete a una descalcificación [6] mediante tratamiento con ácido clorhídrico 1 M durante tres horas a temperatura ambiente, en un matraz con agitación constante. La relación masa de harina/volumen de disolución ácida que dio mejores resultados fue 1/10. Finalmente, se procede a filtrar en un embudo Buchner, haciendo lavados con agua destilada hasta alcanzar la neutralidad del medio.

El tratamiento siguiente es la desproteización química [4,7], la cual se lleva a cabo en un matraz equipado con condensador de reflujo, mediante el empleo de hidróxido de sodio al 4,5%, con una relación masa de harina/volumen de disolución básica de 1/15. El proceso se realiza durante 3 horas, a 65°C y con agitación constante. El producto obtenido se purifica filtrando en un embudo Buchner y realizando lavados con agua destilada caliente hasta lograr la eliminación del exceso de base.

Obtención del quitosano. Este es un proceso de modificación química de la quitina, en el cual las unidades acetilo son eliminadas [6,8], para ello se procedió colocando 5 g de la quitina obtenida en un matraz de 250 mL de capacidad, provisto de un refrigerante para reflujo y sumergido en un baño de parafina. Se agregan 100 mL de disolución de hidróxido de sodio al 70% a 105°C. El sistema se mantiene reflujo, con agitación en una atmósfera de aire, durante dos horas. El producto se purifica por filtrado en un embudo Buchner, realizando lavados con agua destilada, hasta lograr eliminar la alcalinidad del medio.

Medidas viscosimétricas. Para determinar el peso molecular de los polímeros se utilizó un viscosímetro capilar tipo Ubbelohde, equipado con un baño termostático controlado por un recirculador de agua marca Lauda modelo D-97922, con capacidad de regular la temperatura en $\pm 0,01^\circ\text{C}$. Las muestras de quitosano se prepararon por disolución en una mezcla compuesta de ácido acético 0,1 M y cloruro de sodio 0,2 M. La concentración inicial del polímero fue $1,0 \times 10^{-3}$ g/mL en todos los casos. Una vez establecidas las condiciones de trabajo se procedió a determinar el tiempo de caída de la disolución polimérica y, a partir de la ecuación de Poiseuille, calcular su viscosidad. Dicho procedimiento se repitió para otras cuatro soluciones con concentraciones de $8,89 \times 10^{-4}$, $8,00 \times 10^{-4}$, $6,67 \times 10^{-4}$ y $5,71 \times 10^{-4}$ g/mL.

Valoración potenciométrica. Las mediciones se realizaron con un pHmetro Hanna Instrument modelo 93140. Para mediciones precisas es necesario calibrar el aparato; las soluciones tampones utilizadas en el calibrado tenían los siguientes pH 7,01, 4,01 y 10,1.

Para la determinación del contenido de grupos amino de las distintas muestras de quitosano se procede a la disolución de 0,5 g de cada uno de ellos por separado en 20 mL de HCl 0,3 M. A continuación se titula con una solución de NaOH 0,1 M, la cual ha sido valorada previamente con biftalato de potasio como patrón primario.

La valoración se lleva a cabo midiendo el cambio de pH cada 2 mL de base añadida, la adición se realiza de forma lenta y con agitación continua para homogenizar la solución y evitar errores debidos a la posible precipitación del biopolímero. Las medidas se realizan tres veces para cada muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis viscosimétrico del quitosano. En este apartado se presentan los resultados obtenidos en la aplicación de la técnica de viscosimetría capilar a la determinación del peso molecular en muestras de quitosano. Como primer aspecto se ha validado el método, con respecto a los criterios de linealidad y repetibilidad, aplicándolo a una muestra comercial. Para ello se procedió a determinar la viscosidad intrínseca, $[\eta]$, de cuatro submuestras, aplicando la ecuación de Huggins que relaciona la viscosidad reducida (η_{sp}/c_2) con la concentración[9]:

$$\frac{\eta_{sp}}{c_2} = [\eta] + K [\eta]^2 c_2$$

Las medidas viscosimétricas se han realizado, tal y como se ha comentado en la parte experimental, en un viscosímetro capilar de tipo Ubbelohde, a una temperatura de 25°C, utilizando una mezcla compuesta de ácido acético 0,1 M y cloruro de sodio 0,2 M como disolvente, y a una concentración inicial de 1×10^{-3} g/mL.

La representación de la viscosidad reducida como función de la concentración para dos de las cuatro submuestras del quitosano comercial analizadas se presenta en las Figuras 1 y 2. En todos los casos se observa una disminución de la viscosidad reducida a medida que la concentración del polímero disminuye, lo que indica que se cumple la expresión de Huggins para el polímero en estudio, en las condiciones de trabajo utilizadas.

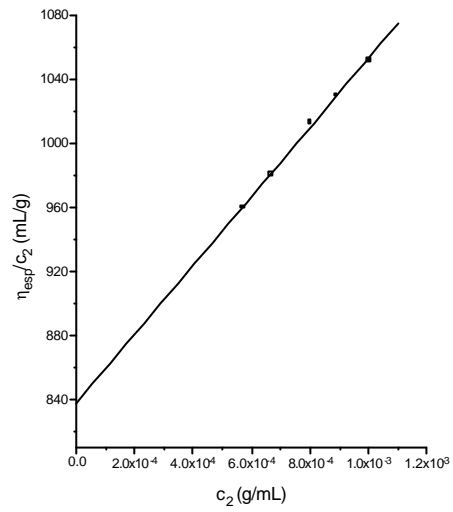


Figura 1. Representación de Huggins, a 25°C en NaCl/HOAc, para quitosano comercial. Submuestra 1.

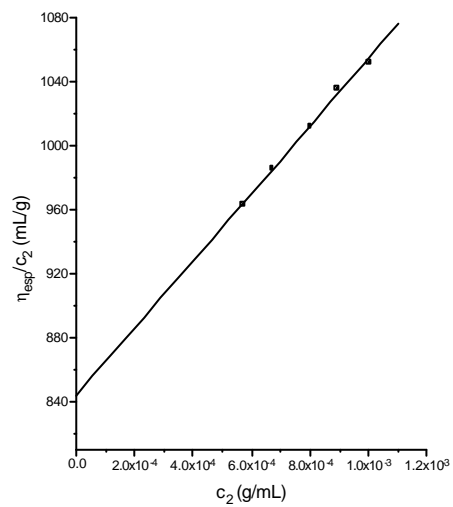


Figura 2. Representación de Huggins, a 25°C en NaCl/HOAc, para quitosano comercial. Submuestra 2.

En las Tablas 1-4 se presentan los resultados del análisis viscosimétrico a 25°C en NaCl/HOAc de quitosano extraído de exoesqueletos de camarón. El cálculo de las líneas de regresión se efectuó por el método de mínimos cuadrados, a partir del ajuste de los valores

de la viscosidad reducida (\bar{y}) en función de la concentración (\bar{x}). El coeficiente de correlación (r) en ninguno de los casos fue menor a 0,998. El intercepto de cada ecuación (a) es igual a la viscosidad intrínseca, y de la pendiente (b) se obtiene la constante de Huggins para cada submuestra. Además, se reportan los valores de la desviación estándar de la regresión (S_r), para cada caso, la que se determinó utilizando la expresión:

$$S_r = \sqrt{(S_{yy} - b^2 S_{xx}) / n - 2}$$

donde

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2 / n$$

y

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2 / n$$

Para la determinación de la repetibilidad del método se comparan entre sí los resultados obtenidos de las experiencias realizadas con las cuatro submuestras de quitosano comercial. El tratamiento estadístico consiste en el análisis de varianza (ANOVA) para establecer si existen o no diferencias significativas entre las rectas de Huggins hechas por el mismo analista en diferentes días. Si no existe diferencia significativa según la prueba F con un determinado nivel de significancia, se establece que el método es repetible en el intervalo de trabajo. Para ello se determina un valor de F experimental (F_{Exp}) que es igual al cociente $(S_{r1})^2 / (S_{r2})^2$. Siendo S_{r1} y S_{r2} las desviaciones estándar de los residuos para las rectas que se están comparando; siendo necesario que se cumpla que $(S_{r1})^2 > (S_{r2})^2$.

El valor de F experimental se compara con un valor obtenido de una tabla de distribución F (F_{Tab}), que debe tener $n_1 - 2$ grados de libertad en el numerador y $n_2 - 2$ grados de libertad en el denominador y un nivel de significancia de al menos 5%. Si $F_{Exp} < F_{Tab}$ se confirma la hipótesis nula, es decir que no existen diferencias estadísticas significativas entre las rectas y el método cumple con la condición de repetibilidad.

Tabla 1. Resultados del análisis viscosimétrico, a 25°C en NaCl/HOAc, de quitosano comercial. Submuestra 1.

Concentración g/mL	Tiempo de caída* segundos	h_{sp} / c_2 mL/g
$1,00 \times 10^{-3}$	172,89	1051,99
$8,89 \times 10^{-4}$	161,43	1030,59
$8,00 \times 10^{-4}$	152,55	1013,35
$6,67 \times 10^{-4}$	139,34	980,83
$5,71 \times 10^{-4}$	130,48	960,27
* $t_0 = 84,25$ s		a = 837,49 b = 216342,99 S _r = 2,10 r = 0,999

Tabla 2. Resultados del análisis viscosimétrico, a 25°C en NaCl/HOAc, de quitosano comercial. Submuestra 2.

Concentración g/mL	Tiempo de caída* segundos	h_{sp} / c_2 mL/g
$1,00 \times 10^{-3}$	172,92	1052,46
$8,89 \times 10^{-4}$	161,82	1035,80
$8,00 \times 10^{-4}$	152,47	1012,16
$6,67 \times 10^{-4}$	139,61	985,55
$5,71 \times 10^{-4}$	130,63	963,38
* $t_0 = 84,25$ s		a = 843,78 b = 211306,88 S _r = 2,81 r = 0,998

Tabla 3. Resultados del análisis viscosimétrico, a 25°C en NaCl/HOAc, de quitosano comercial. Submuestra 3.

Concentración g/mL	Tiempo de caída segundos	η_{esp}/c_2 mL/g
$1,00 \times 10^{-3}$	172,75	1050,45
$8,89 \times 10^{-4}$	161,63	1033,26
$8,00 \times 10^{-4}$	152,54	1013,21
$6,67 \times 10^{-4}$	139,53	983,71
$5,71 \times 10^{-4}$	130,54	961,51
$*t_0 = 84,25 \text{ s}$		$a = 842,76$ $b = 210774,55$ $S_r = 2,79$ $r = 0,998$

Tabla 4. Resultados del análisis viscosimétrico a 25°C en NaCl/HOAc de quitosano comercial. Submuestra 4.

Concentración g/mL	Tiempo de caída segundos	h_{sp}/c_2 mL/g
$1,00 \times 10^{-3}$	172,81	1051,16
$8,89 \times 10^{-4}$	161,53	1031,93
$8,00 \times 10^{-4}$	152,53	1013,06
$6,67 \times 10^{-4}$	139,66	986,53
$5,71 \times 10^{-4}$	130,55	961,72
$*t_0 = 84,25 \text{ s}$		$a = 845,64$ $b = 207687,31$ $S_r = 2,36$ $r = 0,998$

En la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos de la comparación estadística de las rectas de Huggins obtenidas en los experimentos con cuatro submuestras del quitosano comercial. Para las seis comparaciones se tiene que no existen diferencias estadísticas significativas, F_{Exp} es menor que F_{Tab} en todos los casos, y por tanto, queda demostrado que el método cumple con la condición de repetibilidad.

Tabla 5. Análisis de varianza de las rectas de Huggins obtenidas en los experimentos con el quitosano comercial.

Experimento	S_r	S_r^2	F_{Exp}
2	2,81	7,90	1,79
1	2,10	4,41	
3	2,79	7,78	1,76
1	2,10	4,41	
4	2,36	5,57	1,26
1	2,10	4,41	
2	2,81	7,90	1,02
3	2,79	7,78	
2	2,81	7,90	1,42
4	2,36	5,57	
3	2,79	7,78	1,40
4	2,36	5,57	

$$F_{Tab} (F_{3, 3, 1\%}) = 5,39$$

El valor de las constantes de Huggins obtenidas, para las cuatro submuestras de quitosano comercial, indican que la mezcla compuesta de ácido acético 0,1 M y cloruro de sodio 0,2 M es un buen disolvente para el quitosano a 25°C (véase la Tabla 6). En ninguno

de los casos se observan valores de K mayores de 0,5, lo que indica que no existen procesos de agregación.

Tabla 6. Constante de Huggins, viscosidad intrínseca y peso molecular promedio viscoso, para las submuestras de quitosano comercial en NaCl/HOAc a 25°C.

Submuestra	K	$[\eta]$ mL/g	\bar{M}_v g/mol
1	0,31	837,49	$1,24 \times 10^6$
2	0,30	843,78	$1,25 \times 10^6$
3	0,30	842,76	$1,24 \times 10^6$
4	0,29	845,64	$1,25 \times 10^6$
			$\bar{M}_v = 1,25 \times 10^6$ $s = 6 \times 10^3$

La viscosidad intrínseca mide el volumen específico efectivo de un polímero aislado, razón por la que su determinación se realiza extrapolando a concentración nula. Su valor depende del tamaño y forma de la molécula de soluto, así como de su interacción con el disolvente y de la temperatura de trabajo. Para un sistema polímero-disolvente a una temperatura determinada, la expresión de Mark-Houwink puede utilizarse para determinar el peso molecular promedio viscoso de un polímero. Para quitosano en la mezcla 0,1 M HOAC-0,2 M NaCl a 25°C tenemos que [10]:

$$\bar{M}_v = ([\eta] / 1,81 \times 10^{-3})^{1/0,93}$$

Utilizando esa expresión se han calculado los pesos moleculares reportados en la Tabla 6, habiéndose determinado el promedio para las cuatro submuestras de $1,25 \times 10^6$ g/mol, y la desviación estándar de 6×10^3 .

El quitosano obtenido en nuestro laboratorio fue sometido a un análisis viscosimétrico idéntico al descrito anteriormente para el quitosano comercial. En todos los casos se partió de la misma muestra de quitina, realizándose los procedimientos descritos en la parte experimental, habiéndose obtenido un rendimiento máximo de 72%. En la Tabla 7 se presentan los resultados obtenidos del análisis viscosimétrico de tres muestras diferentes de ese material, al igual que en el caso del quitosano comercial, el coeficiente de correlación en ninguna de las experiencias fue menor a 0,998.

Tabla 7. Constante de Huggins, viscosidad intrínseca y peso molecular promedio viscoso, para las muestras de quitosano obtenido, NaCl/HOAc a 25°C.

Muestra	K	$[\eta]$ mL/g	\bar{M}_v g/mol
1	0,29	446,04	$6,27 \times 10^5$
2	0,30	439,88	$6,18 \times 10^5$
3	0,30	441,96	$6,21 \times 10^5$
			$\bar{M}_v = 6,22 \times 10^5$ $s = 5 \times 10^3$

El peso molecular del quitosano obtenido es de $6,22 \times 10^5$ g/mol, y la desviación estándar de 5×10^3 . El valor de peso molecular determinado refleja que las condiciones de la reacción de desacetilación de la quitina son las adecuadas para obtener un polímero de bajo grado de acetilación, lo cual se ha corroborado experimentalmente mediante los resultados obtenidos por medio de la titulación potenciométrica.

Análisis potenciométrico. El contenido de grupos amino en las muestras de quitosano se determinó por titulación potenciométrica [11]. Para ello se disuelve el polímero en ácido clorhídrico y se valora la mezcla con hidróxido sódico, tal y como se describió previamente. Los resultados de la valoración se muestran en las Figuras 3 y 4, para la muestra comercial y la obtenida en el laboratorio, respectivamente. En ambos casos se produce una curva de titulación con dos puntos de inflexión, cuyos valores se determinaron según el criterio de la primera derivada.

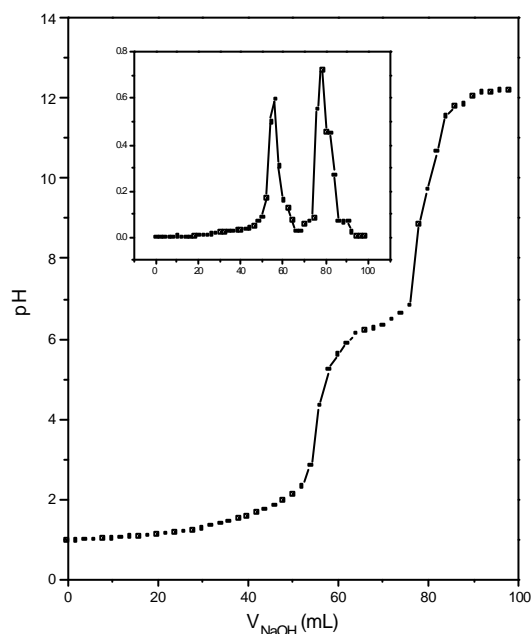


Figura 3. Curva de titulación para el quitosano comercial. En el recuadro se muestra la primera derivada, los máximos corresponden a los puntos de inflexión.

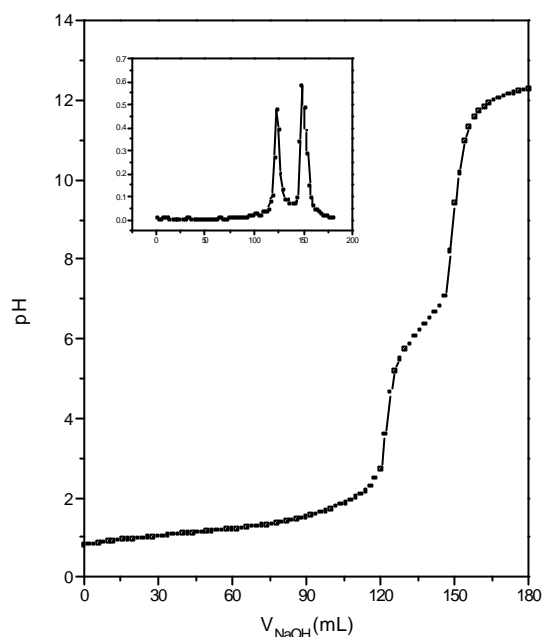


Figura 4. Curva de titulación para el quitosano obtenido. En el recuadro se muestra la primera derivada, los máximos corresponden a los puntos de inflexión.

La diferencia entre los dos puntos de inflexión en la curva de titulación, corresponde a la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del quitosano, la concentración de éstos se determina utilizando la expresión:

$$\% NH_2 = \frac{16,1 (y - x)}{w} f$$

donde y es el punto de inflexión mayor, x corresponde al punto de inflexión menor, ambos expresados como volúmenes, f es la molaridad de la solución de NaOH, w el peso en gramos de la muestra y 16,1 es un valor relacionado con el peso equivalente del quitosano.

El análisis se realizó por triplicado, habiéndose obtenido los resultados que se presentan en la Tabla 8. Como era de esperar, la proporción de grupos amino es mayor en el quitosano obtenido que en la muestra comercial, lo que es indicativo de que el método

de síntesis utilizado permite la obtención de un producto altamente desacetilado. Tales resultados son congruentes con los obtenidos previamente por espectroscopia infrarroja [12], que indican un grado de acetilación de 21,28%.

Tabla 8. Resultados del análisis de la proporción de grupos amino en las muestras de quitosano, por titulación potenciométrica. Se presenta la media de tres experimentos.

Muestra	y (mL)	x (mL)	y - x (mL)	% NH ₂
Quitosano Comercial	78,45	56,71	21,74	67,20 %
Quitosano Obtenido	148,17	122,17	26,00	80,37 %

CONCLUSIONES

Se ha demostrado, a partir de las experiencias realizadas, que el método viscosimétrico aplicado a la determinación del peso molecular del quitosano cumple con las condiciones de linealidad y repetibilidad. Además, en las condiciones de trabajo descritas, no se presentan procesos de agregación.

El peso molecular del quitosano obtenido es de $6,22 \times 10^5$ g/mol, esto refleja que las condiciones de la reacción de desacetilación de la quitina propuestas en este trabajo son las adecuadas para obtener un polímero que cumple con los estándares industriales. Los resultados de la determinación del grado de acetilación por potenciometría indican que el polímero sintetizado en el laboratorio posee un grado de acetilación menor que la muestra comercial y, por tanto, una proporción mayor de grupos amino.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Zikakis JP (Editor) "Chitin, Chitosan and Related Enzymes". Academic Press, Orlando. 1984.
- [2] Muzzarelli RAA (Editor) "Natural Chelating Polymers", Pergamon Press, New York. 1973.
- [3] Ravi Kumar MNV "A review of chitin and chitosan applications", *Reactive & Functional Polymers*, **46**,1 (2000)
- [4] Meyers SP y Bligh D, *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 505 (1981)
- [5] Cañipa A J, Tesis de Maestría. UNAM, Facultad de Química, México, 1994
- [6] Bough AA, Wu CM, Campbell MR y Perkins BE, *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1945 (1978)
- [7] Mathur NK y Narang CK, *J. Chem. Educ.*, **67**, 938 (1990)
- [8] Muzzarelli RAA (Editor) "Chitin". Faculty of Medicine, University of Ancona, Ancona, Italy Pergamon Press. 1973
- [9] Huggins ML, *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, 2716 (1942)
- [10] Maghami G y Roberts G, *Makromol Chem.*, **189**, 195, (1988)
- [11] Broussignac P, *Chem. Ind. Genie Chim.*, **99**, 1241 (1968)
- [12] Díaz Crespín G, Tesis de Licenciatura, UES, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, 2002