

Influencia de Algunos Ácidos Orgánicos Sobre las Propiedades Físico-Químicas de Películas de Quitosano Obtenidas a Partir de Desechos de Cangrejo

A. Araya, L. Meneses
Escuela de Ciencias Químicas
Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Casilla 17-01-2184, Quito, Ecuador
afaraya@puce.edu.ec, lmmeneses@puce.edu.ec

Resumen

*El objetivo de este estudio fue conocer la influencia de los ácidos acético, fórmico y láctico en las características físico-químicas de películas de quitosano. Para el efecto se realizaron los tratamientos de desmineralización, desproteinización y despigmentación de desechos de cangrejo rojo (*Ucides Occidentalis Ortmam*) para obtener quitina, la cual fue desacetilada con hidróxido de sodio 50 % p/v para obtener quitosano. Este quitosano fue caracterizado por las técnicas de espectroscopía de absorción de infrarrojos y titulación potenciométrica, obteniendo valores de grado de desacetilación promedio de 67.0 % y 62.7 % respectivamente. Se determinó el peso molecular por el método viscosimétrico con un valor promedio de $1.26 \cdot 10^5$ g/mol del polímero. Para formar películas transparentes, se utilizaron soluciones 5% v/v de ácido fórmico, ácido acético y ácido láctico. Las películas presentaron mayor resistencia tensil al ser tratadas con ácido acético y ácido láctico. Por espectroscopía de infrarrojos se logró apreciar las bandas características de las películas de quitosano, demostrando que la parte estructural química tiene ligeras variaciones dependiendo del ácido utilizado para su formación.*

Palabras clave: Grado de desacetilación, quitina, quitosano, película, cangrejo rojo.

Abstract

*The purpose of this work was to determine the effect on the properties of chitosan films when acetic acid, formic and lactic acid were used. In order to obtain chitin from scrap of red crabs (*Ucides occidentalis ortman*), treatments such as demineralization, depigmentation and deproteination were performed. Subsequently the chitin was desacetyled with sodium-hydroxide 50% w/v to obtain chitosan. The obtained chitosan was characterized by both techniques, infrared spectrometry and potentiometric titration, showing the degree of deacetylation average values of 67.0% and 62.7% respectively. The molecular weight was determinate by the viscosimetric method with an average value of $1.26 \cdot 10^5$ g/mol of the polymer. Knowing the characteristics of chitosan, we used 5% v/v solutions of formic, acetic and lactic acid, achieving transparent films, which showed a higher resistance by treatments with acetic acid and lactic acid. Infrared method permitted us to see the typical peaks of the films, which displayed a slightly difference on the chemical structures due to the organic acid.*

Keywords: degree of deacetylation, chitosan, chitin, film, red crab.

1. Introducción

Los desechos de crustáceos producidos por la industria pesquera son la materia prima para la industrialización de la quitina. El procedimiento consiste en aislar las proteínas, minerales generalmente calcáreos y pigmentos [1]. Las etapas de este procedimiento se denominan procesos de desproteinización y desmineralización.

El quitosano, principal derivado de la quitina, se obtiene industrialmente mediante tratamiento de desacetilación químico o enzimático [2]. Dependiendo

de las condiciones de reacción, se obtienen quitosanos de diferente peso molecular y grado de desacetilación, estas variables los hacen útiles en diversas aplicaciones [3].

El interés comercial de los productos derivados de la quitina se refleja en el creciente número y complejidad de las patentes otorgadas. Tan solo en Estados Unidos, en el período entre 1976 y 1999, se registraron 2064 patentes relacionadas con el quitosano, mientras que en los años 1999-2004 se tienen otras 2939 patentes registradas en la Oficina de Patentes de Estados Unidos -U.S Patent and

Trademark Office-. La mayor parte de las patentes tienen aplicaciones potenciales en alimentos, agricultura, cosméticos y cuidado personal, textiles, medicina y tratamiento de aguas [4].

El quitosano, debido a su propiedad de formar filmes o películas semipermeables, se ha usado en varios campos industriales [5]. Las películas de este biopolímero son delgadas, elásticas y resistentes, es por todo esto que el objetivo principal de este trabajo fue determinar las características físico-químicas de estas películas con el uso de diferentes ácidos orgánicos a partir de los desechos del cangrejo rojo.

El Ecuador es reconocido por ser uno de los países exportadores de diferentes mariscos, pero producto de toda esta industrialización, actualmente posee gran porcentaje de desperdicios. Se estima que 2500 familias dependen directa o indirectamente del recurso cangrejo rojo. De estos, aproximadamente 1800 personas se dedican directamente a la extracción de *Ucides occidentalis ortman* en los manglares distribuidos entre el Golfo de Guayaquil y Archipiélago de Jambelí [6]. Por lo que otro objetivo de este trabajo fue contribuir con el uso de los desechos del cangrejo para la formación de películas de quitosano, ya que estas poseen multiplicidad de usos en diferentes áreas de la industria.

2. Metodología

2.1. Tratamiento de materia prima

Los desechos de cangrejo rojo se molieron y con ayuda de un conjunto de tamices se obtuvieron tamaños de partículas entre 710 μ m a 425 μ m. Una operación importante es la eliminación de materia orgánica u otro material extraño adherido a la superficie. Para lograr esto se realizaron lavados sucesivos con agua destilada durante 12 horas a 90°C. La materia prima se la caracterizó mediante métodos analíticos recomendados por la A.O.A.C. Para proteína por el método de Kjeldhal, técnica 32.1.22 A.O.A.C. y cenizas técnica AOAC 942.05 [7].

2.2. Obtención y caracterización de quitina

El proceso de obtención de quitina implicó tres operaciones básicas. La separación de la proteína con hidróxido de sodio 10% p/v, la desmineralización con ácido clorhídrico 5 M y la separación de los pigmentos lipídicos (carotenoides) con hipoclorito de sodio 0.5 % v/v.

Posteriormente, todas las muestras de quitina se sometieron a métodos analíticos de cenizas y proteína mediante las técnicas recomendadas por la A.O.A.C. ya descritas..

2.3. Obtención y caracterización de quitosano

Para la obtención de quitosano en este trabajo, se utilizó hidróxido de sodio 50% p/v a temperatura de 110°C por 6 horas con agitación constante. Posteriormente se lavó con agua destilada caliente hasta llegar a pH 7.5 y se llevó a la estufa a temperatura de 80°C por 6 horas. El quitosano se mantuvo en un desecador para evitar que se hidrate y obtener resultados reproducibles y confiables. Luego se caracterizó utilizando las técnicas de espectroscopia de infrarrojos, titulación potenciométrica y viscosimetría. Se obtuvo el grado de desacetilación de la muestra de quitosano, y se determinó las áreas de las absorbancias de las bandas en 1655 y 3450 cm^{-1} , en un espectrofómeto de infrarrojos Perkin Elmer FTIR BXII con dispositivo HATR.

En la técnica de espectroscopia de infrarrojos para medir el grado de desacetilación, las muestras pueden prepararse para su análisis en forma de películas o en pastillas de bromuro de potasio.

En las Figuras 1 y 2 se muestran las estructuras químicas de quitina y quitosano, pues es importante tenerlas presente para entender de mejor manera cuáles son los grupos funcionales de importancia en este tipo de polímeros [8].

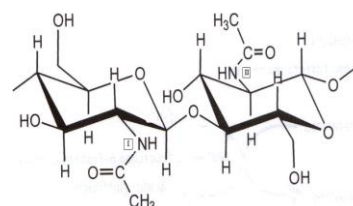


Figura 1. Quitina

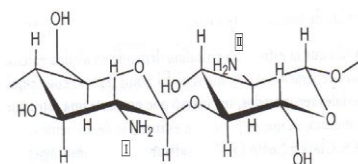


Figura 2. Quitosano

La técnica de infrarrojos se basa en la relación de absorbancias entre dos bandas de absorción determinadas, con el tanto por ciento de acetilación del quitosano. La selección de las bandas de absorción involucra una señal que depende del grado de N-acetilación “normalmente, la banda amida” y otra que sirve como referencia interna para corregir las diferencias de espesor de las películas o de concentración en las pastillas de bromuro de potasio. En el método de Baxter et.al [9], el grado de N-acetilación se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\%GD = 100 - (A_{1655}/A_{3450}) * 115 \quad (1)$$

donde A_{1655} y A_{3450} son las absorbancias correspondientes, respectivamente, a la amida I de la quitina y a la de referencia.

La determinación potenciométrica del grado de N-acetilación del quitosano se realizó por el método propuestos por Broussignac [10,11]. Se disolvió el quitosano en un exceso conocido de HCl con agitación constante. La solución de quitosano se valoró con una solución de NaOH y se usó un pH-metro Obeco-Hellige Senso Direct pH200, equipado con un electrodo de vidrio y un electrodo de calomel. Se obtuvo así, una curva de pH versus volumen de NaOH añadido. Esta curva presenta dos puntos de inflexión como se puede apreciar en la Figura 3.

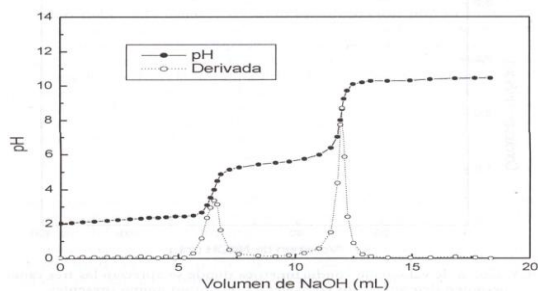


Figura 3. Curva típica de valoración potenciométrica de quitosano en la que se muestra los dos puntos de inflexión que permiten determinar el grado de acetilación de la muestra

La diferencia de volumen entre estos dos puntos corresponde con el ácido consumido para la protonación de los grupos amino y permite la determinación del grado de acetilación de quitosano.

La viscosimetría es el método más utilizado para obtener el peso molecular del quitosano. El método tiene la desventaja de no ser una técnica absoluta, por lo que requiere la determinación de las constantes mediante la correlación de valores de viscosidad intrínseca con valores de pesos moleculares medidos por un método absoluto. Su principal ventaja radica en la sencillez. Se basa en la obtención de la viscosidad intrínseca $[\eta]$, que está relacionada con el peso molecular en la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada [12]:

$$[\eta] = K M^a \quad (2)$$

En esta ecuación, M es el peso molecular promedio viscosimétrico, K y a son dos constantes que dependen de la naturaleza del polímero, del sistema disolvente utilizado y de la temperatura. Los valores de las constantes K y a para el caso del quitosano en ácido acético 0.3M son $K=0.074$ y $a=0.76$ a 25°C . Particularmente en el quitosano, la extensión del grado de N-acetilación y la polidispersidad respecto del contenido de residuos N-acetilo deben controlarse durante la calibración por su influencia sobre el comportamiento reológico de la disolución. También debe tenerse en cuenta la tendencia del quitosano a formar agregados, que hace necesario clarificar cuidadosamente las soluciones por filtración y/o centrifugación.

Se utilizó el viscosímetro de Ostwald y se midió el tiempo que tarda el nivel de la disolución en pasar

entre dos marcas fijadas y se relacionan con la viscosidad mediante la ecuación de Poiseuille:

$$v = \frac{\pi P r^4}{8 \eta l} \quad (3)$$

En esta ecuación, v es la velocidad de flujo del volumen contenido entre las dos marcas, P es la diferencia de presión que mantiene el flujo, r es el radio capilar, η es la viscosidad del líquido y l la longitud del capilar. Esta ecuación es válida para un flujo newtoniano y laminar.

2.4 Obtención de películas de quitosano

Una de las propiedades más interesantes del quitosano es su capacidad para formar películas. Para este efecto se prepararon soluciones al 3% de quitosano en soluciones al 5% v/v de ácido acético, ácido fórmico y ácido láctico. En todos los casos se disolvió la muestra a 70°C con agitación constante. Posteriormente se colocaron 5 gotas de glicerol.

En cajas petri de 8cm de diámetro, bien limpias y secas, se colocaron 20 ml de suspensión de quitosano. Luego de formarse las películas, se secó a temperatura ambiente por 5 días, finalmente fueron desmoldadas con solución de hidróxido de sodio al 0,1 %. A las películas formadas se les caracterizó por métodos físicos y químicos.

3. Resultados y Discusión

3.1. Composición de la materia prima

La calidad de la materia prima y del quitosano es muy importante al momento de preparar las películas, ya que influyen marcadamente en sus propiedades. Por lo que para conocer la composición de la materia prima se determinaron las cenizas y las proteínas presentes en los desechos del cangrejo rojo. Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición química de la materia prima

Parámetros	\bar{X}	σ
Cenizas	55.20%	2,13
Proteínas	22.30%	1,94

3.2. Composición de la quitina

La dureza del exoesqueleto del cangrejo rojo se debe principalmente a la gran cantidad de carbonatos y a la proteína asociada al polímero de quitina. A continuación se detalla en la Tabla 2 la composición de cenizas y proteína de la quitina obtenida.

Tabla 2. Composición química de la quitina

Parámetros	\bar{X}	σ
Cenizas	40,38%	1,62
Proteínas	12,01%	0,79

En la Tabla 2 se puede apreciar que el tratamiento empleado no logró desmineralizar completamente a la materia prima, ya que todavía se tiene un alto contenido de cenizas, pero con este mismo tratamiento si se logró disminuir apreciablemente el porcentaje de proteína. La dificultad de bajar el porcentaje de materia inorgánica se debe a que la matriz que se utilizó es muy rígida y no permite que penetre con facilidad el ácido clorhídrico.

Todos estos resultados expuestos indican que el cangrejo tiene una gran cantidad de minerales y poca cantidad de proteínas. Es por eso que tener un tratamiento estándar adecuado para la obtención de quitina a partir de crustáceos no es en todos los casos posible, ya que depende de la matriz de trabajo [13].

3.3 Caracterización del quitosano

En primer lugar se determinó el grado de desacetilación del quitosano obtenido, por medio de espectrofotometría infrarroja, tomando en cuenta las bandas en 1655 y 3450 cm^{-1} . En las Figuras 4 y 5 se muestran los espectros IR de quitosano en las bandas de interés. Al representar estos espectros en % de transmitancia, las bandas de interés presentan valores significativos, además de concordar con lo que está reportado en literatura [14].

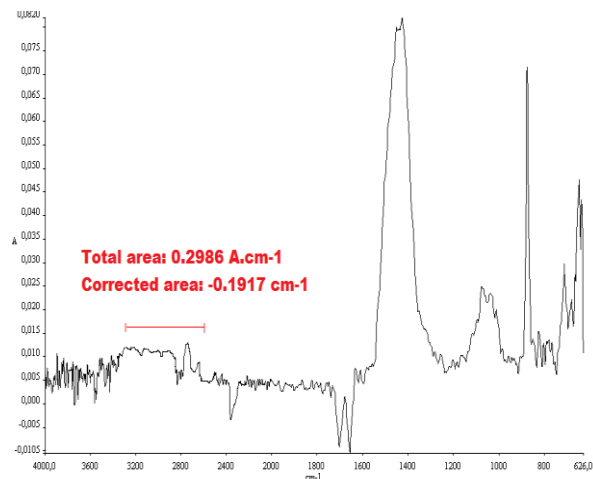


Figura 4. Espectro del quitosano en la banda 3450 cm^{-1}

Además, se determinó el grado de desacetilación del quitosano por el método de titulación potenciométrica [10,11], obteniendo los resultados que se muestran en la Figura 6.

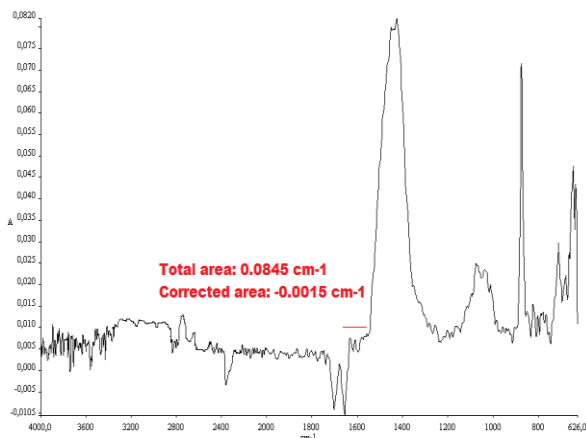


Figura 5. Espectro del quitosano en la banda 1655 cm^{-1}

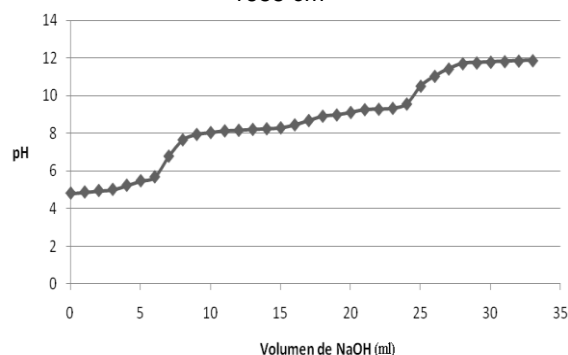


Figura 6. Curva de titulación potenciométrica

Considerando las gráficas del espectro infrarrojo y de titulación potenciométrica, se obtuvieron los siguientes resultados de grado de desacetilación para el quitosano en muestras por duplicado.

Tabla 3. Determinación del grado de desacetilación del quitosano obtenido

Quitosano obtenido	%GD IR	%GD titulación potenciométrica
Muestra 1	67.60	63.48
Muestra 2	66.30	61.97

Como se puede observar en la Tabla 3 no existe gran diferencia en el grado de desacetilación del quitosano por los dos métodos ya que el error promedio es de 6.3%, considerando que el método de infrarrojos es más preciso.

Struszczyk, et.al. [15] indican que el valor óptimo de desacetilación para el quitosano debe ser mayor a 50%. Los resultados que se muestran en la Tabla 3 indican que el tratamiento para desacetilar la quitina fue adecuado.

Estudios previos demuestran que existe una variación en términos de grado de desacetilación y consecuentemente la presencia de grupos amino libres para los quitosanos de diferentes crustáceos [16].

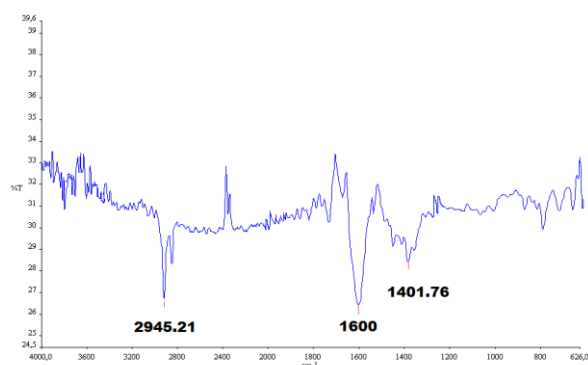
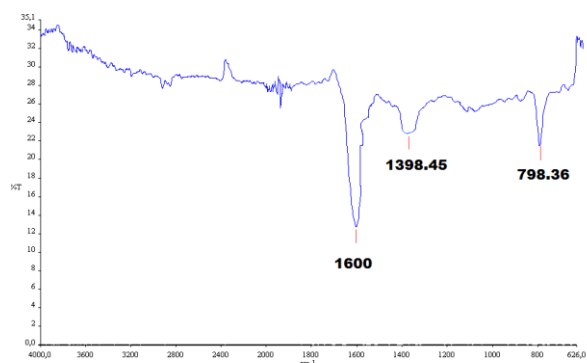
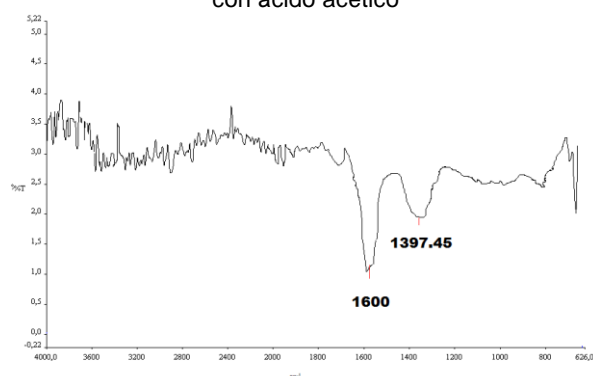
Los pesos moleculares obtenidos por viscosimetría a partir de las ecuaciones 2 y 3 para este trabajo se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Determinación del peso molecular del quitosano

Quitosano obtenido	Peso molecular g/mol
Muestra 1	$1.21 \cdot 10^5$
Muestra 2	$1.30 \cdot 10^5$

En los resultados de la Tabla 4 se puede apreciar que el quitosano de la muestra 2 tiene un peso molecular mayor que la muestra 1. Evidenciándonos que mientras mayor sea el grado de desacetilación menor será el peso molecular, lo cual concuerda con lo que está reportado en la literatura [17].

Los espectros IR de las películas de quitosano formadas con diferentes ácidos se presentan en las Figuras 7, 8 y 9.

**Figura 7.** Espectro de la película de quitosano tratada con ácido fórmico**Figura 8.** Espectro de la película de quitosano tratada con ácido acético**Figura 9.** Espectro de la película de quitosano tratada con ácido láctico

Las Figuras 7 a 9 indican que existió una estrecha interacción entre el quitosano y el ácido orgánico, ya que muestran un pico representativo alrededor de 1600 cm^{-1} el cual corresponde al grupo amida. Esta banda demuestra que los ácidos usados lograron penetrar la red cristalina del quitosano y formar amidas.

Además se presenta otro pico característico en estas Figuras alrededor de 1400 cm^{-1} indicativo de los grupos CN del amino, lo que demuestra la incorporación de grupos carboxílicos a la estructura del quitosano. Esta banda representa según otros autores el tiempo de calentamiento de reacción, es decir, al existir grupos amino que reaccionen con el ácido se formará la amida, pero para que exista una reacción completa dependerá del pKa y la solubilidad. Considerando el tamaño de esta banda podemos ver que el ácido acético presentó una mayor interacción con la estructura del polímero en comparación con los otros ácidos orgánicos con un pKa de 4.74, siguiéndole el ácido láctico con un pKa de 3.86 y finalmente el ácido fórmico con un pKa de 3.75. Por medio de estos resultados se puede deducir que la solubilidad del quitosano con el ácido orgánico va a depender de la acidez y de la estructura química del ácido. Para comprobar estas observaciones, sería interesante probar con una serie más grande de ácidos orgánicos, para ver el efecto del pKa sobre la solubilidad del quitosano.

El ácido fórmico es el único que muestra un pico grande alrededor de 2922 cm^{-1} correspondiente a la tensión de los grupos CH. El ácido acético presenta un pico definido por 798 cm^{-1} representativo del balanceo de los grupos CH_2 .

Los resultados obtenidos de la caracterización física de las películas de quitosano se presentan en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Color de las películas de quitosano

Muestra	Color
Acido fórmico	Transparente
Acido Acético	Transparente
Acido Láctico	Transparente

La Tabla 5 nos indica que existió un buen efecto del tipo de ácido usado en este estudio, ya que teóricamente el tratamiento que se siguió debía dar como resultado películas transparentes [18].

Tabla 6. Resistencia de las películas de quitosano

Muestra	Resistencia N/m^2
Acido fórmico	0.0117
Acido Acético	57.161
Acido Láctico	32.672

Los datos de la Tabla 6 son una estimación de la resistencia tensil de las películas de quitosano. Pero se puede diferenciar muy claramente que la película con más resistencia a la tensión es la que tiene ácido acético, seguido de la película que posee ácido láctico. Estos resultados nos ayudaron a deducir que el ácido acético fue el que más interactuó con el quitosano debido a su menor acidez. Mientras mayor es la acidez

del ácido orgánico utilizado, menor es la interacción con el polímero. Esto se podría comprobar con espectros de $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ que permitan ver las interacciones de los ácidos con la estructura del polímero.

Cabe también indicar que la película que tiende a elongarse con mayor facilidad es la que fue tratada con ácido láctico, seguida de la película que tiene ácido fórmico. Demostrando así que las características físicas de las películas también van a depender de la estructura química del ácido.

Con los resultados obtenidos en este estudio, se pretende dar soluciones al impacto ambiental que generan los desechos de cangrejo rojo en el Ecuador, ya que llevando este procedimiento a escala industrial, sería posible utilizar la gran cantidad de desechos que se vierten en suelos y aguas, reduciendo así sus efectos sobre el ambiente. Además las películas de quitosano que se lograron obtener poseen características físicas y químicas que podrían servir para los campos de la medicina, alimentos, agricultura etc.

4. Conclusiones

Se obtuvieron películas transparentes de quitosano a partir de desechos de cangrejo rojo *Ucides occidentalis* ortma, por medio del uso de ácido fórmico, ácido acético y ácido láctico, los cuales presentan diferentes propiedades físico-químicas que dependen de la acidez y estructura química del ácido.

Mediante la aplicación de la técnica de espectroscopía de infrarrojos, se caracterizaron las películas de quitosano, encontrando bandas características que permiten diferenciarlos.

La obtención de películas de quitosano aporta a las investigaciones científicas en el área de la biotecnología y plantea ayudar a solucionar el impacto ambiental que se genera debido a los desechos del cangrejo rojo.

5. Agradecimientos

Parte de este trabajo fue financiado por la DGA-PUCE mediante el proyecto E13042. Queremos agradecer al Ing. Marcelo Parreño por su colaboración, lo que permitió un mejor desarrollo de este proyecto.

6. Referencias

[1] Roberts, G. (1992). **Chitin Chemistry**, Londres.
 [2] Peniché, C. (2006), **Estudios sobre quitina y quitosano**, Tesis para la obtención de doctorado en biopolímeros, Universidad de la Habana. Cuba.
 [3] Gupta, C. (2006). **Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres**, Elsevier, India.

[4] United States Patent and Trademark Office (2004) <http://uspto.gov/patft/index.html>.

[5] Pistonesi, M. (2001). **Obtención de quitosano estándar y su aplicación para el tratamiento de aguas residuales**, Tesis Doctoral Universidad Nacional del Sur, Facultad de Química, Chile.

[6] Chalén, X., Correa, J. (2003). **Seguimiento de la actividad extractiva del cangrejo rojo durante la veda**, Documento interno INP (Instituto Nacional de Pesca), pp 21

[7] Horwitz, W. (2000), **Official Methods of Analysis of A.O.A.C International**, 17th edition, Association of Official Analytical Chemist OMA, Estados Unidos, pp 95-109.

[8] Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., Rinaudo, M. (2001). **An infrared investigation in relation with chitosan and chitosan characterization**, Polymer, 42/8, pp 3569-3580.

[9] Baxter, A., Dillon, M., Taylor, A., Roberts, G. (1992). **Improved method for I.R, determination of the degree of N-acetylation of chitosan**, Int. J. of Biol. Macromol. 14/3, pp 166-169.

[10] Broussignac, P. (1968). **Chitosan: a natural polymer not well know by the industry**, Genie Chimique, 99/9, pp 1241-1247.

[11] Parada, L., Crespín, G., Miranda R., Issa, K. (2004). **Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica**, Revista Iberoamericana de Polímeros, 5/1, pp 5-7.

[12] Rinaudo, M., Milas, M., Le Dung, P. (1993). **Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion**, Int. J. of Biol. Macromol. 15/5, pp 281-285.

[13] Vincendon, M., Roux, L. (1989). **Chitin and Chitosan**, Elsevier, Londres, pp 437.

[14] Argüelles, W., Heras, A., Acosta, N., Galed, G., Gallardo, A., Miralles, B., Peniche, C., San Román J. (2004) en **Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones**, Programa CYTED, CIAD, Pontificia Universidad Católica del Perú, pp 160-162.

[15] Struszczyk, H., Kivekäs, O. (1989). **Some New Applications of Chitosan in Agriculture. Chitin and Chitosan Sources**, Elsevier, 52, pp 743-747.

[16] Pastor, A., (2000). **Determinación de quitina y quitosano por Espectrometría Infrarroja**, Tesis de Ingeniería, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú.

[17] Changhong, P., Weijun, Y., Motang, T. (2003). **Chemical Modification of Chitosan: Synthesis and Characterization of Chitosan-Crown ethers**, J. Appl. Polym. Sci, 87/14, pp 2221-2225.

[18] Alvarado, J.y Amaral, P., (2000). **Tecnología de películas de biodegradables para alimentos en IberoAmérica**, Proyecto CYTED XI.